



دانشگاه علوم پزشکی قزوین

دانشکده پزشکی

گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان :

فراوانی ژن های مقاومت به کینولون ها وابسته به پلاسمید (*qnr*) در ایزوله های بالینی اشرشیاکلی

جدا شده از بخش های مراقبت ویژه بیمارستان های قزوین ، کرج و تهران

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر امیر پیمانی

سرکار خانم دکتر آمنه باریکانی

نگارش:

فرنناز یوسفی

شماره ثبت: ۵۳

سال فراغت از تحصیل: ۱۳۹۴



تقديم به:

به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم،دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم،چشمان سبز مادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران

مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.

تقدیم به همسرم به پاس قدر دانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از

سلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است

قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بنمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند
و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند...

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست...

با تقدیر و تشکر از اساتید بزرگوارم:

استاد راهنمای گرامی سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر

استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر پیمانی

جناب آقای دکتر ناصرپور فریور

اساتید گرامی گروه میکروب شناسی

کارکنان و کارشناسان آزمایشگاههای میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی

معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی

که در تمامی مراحل این پایان نامه از رهنمودهای ارزنده شان بهره مند شدم.

چکیده:

زمینه و هدف: اشرشیاکلی یک پاتوژن فرصت طلب و از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی

به ویژه در بخش های مراقبت ویژه محسوب می شوند. در سال های اخیر پیدایش مقاومت به کینولون ها

به واسطه پلاسמיד (*qnr*) رو به افزایش بوده که این منجر به محدود شدن راه های کنترل عفونت و گزینه های درمانی صحیح شده است. هدف اصلی این مطالعه فراوانی ژن های مقاومت به کینولون ها وابسته به پلاسמיד (*qnr*) در ایزوله های بالینی اشرشیاکلی جدا شده از بخش های مراقبت ویژه بیمارستان های قزوین ، کرج و تهران می باشد.

روش کار: ۲۴۰ ایزوله اشرشیاکلی از بخش های مراقبت ویژه بیمارستان های شهر های قزوین، تهران و کرج در طی سالهای ۱۳۹۳-۱۳۹۲ جمع آوری گردید. ایزوله ها بعد از تعیین هویت از نظر مقاومت به داروهای کینولونی با روش دیسک دیفیوژن آگار بررسی شدند . سپس حداقل غلظت مهاري به روش آگار دایلوژن طبق دستورالعمل CLSI انجام و تفسیر گردید و ایزوله های غیر حساس به کینولون ها از نظر وجود ژن های *qnrA, qnrB, qnrB4, qnrS* با استفاده از روش PCR و پرایمر های اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت و سپس با تعیین توالی حضور ژن ها مورد تایید قرار گرفتند.

یافته ها: در مجموع ۱۵۲ ایزوله (۶۳/۳٪) نسبت به یکی از داروهای خانواده کینولون به کار رفته در این مطالعه مقاومت کامل را نشان دادند، که از مجموع ۱۵۲ ایزوله، ۱۳۳ (۸۷/۵٪) ایزوله مقاومت سطح بالا و ۱۹ (۱۲/۵٪) ایزوله مقاومت سطح پایین دارند. در این مطالعه میزان مقاومت به گنتی فلوکساسین، لووفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید به ترتیب شامل (۵۲٪، ۱۲۵٪، ۵۳/۸٪، ۱۲۹٪، ۵۴/۱٪، ۱۳۰٪، ۵۳/۳٪، ۱۲۸٪، ۵۵٪، ۱۳۲٪، ۶۳/۳٪) ۱۵۲ می باشد، که از میان آن ها ۵۹ (۳۸/۸٪) ایزوله از نظر تولید ژن های *qnr* مثبت شدند. از ۱۳۷ ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۲۳ ایزوله میزان MIC آن ها در دامنه ۲۵۶-۴ g/ml می باشد. نتایج حاصل از آزمون PCR نشان داد که ۴۵ (۲۹/۶٪) ایزوله دارای ژن *qnrB4*، ۵ (۳/۲٪) ایزوله دارای ژن *qnrS1* و ۹ (۵/۹٪) ایزوله

به طور مشترک دارای ژن های *qnrB4* و *qnrS1* بودند در این مطالعه *qnrA* و *qnrB* یافت نشد. فراوان ترین ژن در این مطالعه، *qnrB4* (۳۵/۵٪) و متعاقب آن *qnrS1* (۹/۲٪) می باشد.

نتیجه گیری: نتایج نهایی حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که میزان مقاومت به کینولون ها به واسطه ژن های پلاسמידی (*qnr*) در بیمارستان های مورد مطالعه در بخش ICU دارای شیوع بالا و قابل توجهی می باشند، بنابراین استفاده از راهکارهای درمانی مناسب و تجویز درست و منطقی آنتی بیوتیک ها توسط پزشکان در کنترل آن ها نیز حائز اهمیت است.

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی، مقاومت به کینولون ها، ژن های *qnr*، ICU

فهرست مطالب

چکیده.....	V
فصل اول.....	۱
۱-۱ بیان مسأله.....	۲
۲-۱ انتروباکتریاسیه.....	۳
۳-۱ تاریخچه.....	۵
۴-۱ طبقه بندی.....	۶
۵-۱ گونه های اشرشیا.....	۷
۱-۵-۱ <i>E.coli</i>	۷
۲-۵-۱ <i>E.albertii</i>	۸
۳-۵-۱ <i>E.hermannii</i>	۸
۴-۵-۱ <i>E.fergusonii</i>	۸
۵-۴-۱ <i>E.vulneris</i>	۸
۶-۱ مرفولوژی اشرشیا.....	۸
۷-۱ خصوصیات کشت و بیوشیمیایی اشرشیا.....	۹
۸-۱ ژنتیک.....	۱۲
۹-۱ ساختار آنتی ژنیک و دیواره سلولی <i>E.coli</i>	۱۳
۱-۹-۱ آنتی ژن O.....	۱۴
۱-۱-۹-۱ هسته مرکزی پلی ساکارید.....	۱۴
۲-۱-۹-۱ لیپید A.....	۱۵

- ۱۵..... ۳-۱-۹-۱ آنتی ژن اختصاصی O
- ۱۵..... ۲-۹-۱ آنتی ژن K
- ۱۶..... ۳-۹-۱ آنتی ژن H
- ۱۷..... ۴-۹-۱ آنتی ژن F
- ۱۷..... ۱۰-۱ فاکتورهای بیماریزایی
- ۱۷..... ۱-۱۰-۱ ادھزین های فیمبریه ای
- ۱۹..... ۲-۱۰-۱ ادھزین های غیر فیمبریه ای
- ۲۰..... ۲-۱۰-۱ اندوتوکسین
- ۲۰..... ۳-۱۰-۱ فلاژل
- ۲۰..... ۴-۱۰-۱ اگزوتوکسین ها
- ۲۱..... ۱-۴-۱۰-۱ انتروتوکسین
- ۲۱..... ۱-۱-۴-۱۰-۱ ST
- ۲۱..... ۲-۱-۴-۱۰-۱ LT
- ۲۲..... ۲-۴-۱۰-۱ وروتوکسین
- ۲۳..... ۳-۴-۱۰-۱ فاکتور نکروزکننده سایتوتوکسیک
- ۲۳..... ۵-۱۰-۱ سیدروفور
- ۲۴..... ۶-۱۰-۱ کولیسین
- ۲۴..... ۷-۱۰-۱ همولیزین آلفا
- ۲۴..... ۹-۱۰-۱ کپسول
- ۲۵..... ۱۰-۱۰-۱ تغییر فاز آنتی ژنی

۱۱-۱۰-۱	سیستم ترش‌حی فاز III	۲۵
۱۲-۱۰-۱	جزایر پاتوزنیسیته	۲۵
۱۱-۱	روش های تایپینگ <i>E.coli</i>	۲۶
۱-۱۱-۱	فنوتایپینگ	۲۶
۱-۱-۱۱-۱	سروتایپینگ	۲۶
۲-۱-۱۱-۱	بیوتایپینگ	۲۶
۳-۱-۱۱-۱	فاژتایپینگ	۲۷
۴-۱-۱۱-۱	تایپینگ با آنتی سرم	۲۷
۲-۱۱-۱	روش های مولکولی	۲۷
۱۲-۱	تشخیص آزمایشگاهی	۲۸
۱-۱۲-۱	روش کلاسیک	۲۹
۱-۱-۱۲-۱	کشت	۲۹
۲-۱-۱۲-۱	سرولوژی	۲۹
۳-۱۲-۱	روش مولکولی	۲۹
۴-۱۲-۱	روش کشت سلولی	۳۰
۱۳-۱	بیماریزایی	۳۱
۱-۱۳-۱	عفونت های خارج روده ای	۳۲
۱-۱-۱۳-۱	عفونت های فرصت طلب	۳۳
۲-۱-۱۳-۱	عفونت های داخل شکمی	۳۴
۳-۱-۱۳-۱	منتزیت نوزادان	۳۴

۳۵ ۱-۳-۱-۱۳-۱ تظاهرات بالینی
۳۵ ۴-۱-۱۳-۱ عفونت های دستگاه ادراری
۳۷ ۱-۴-۱-۱۳-۱ اورتریت
۳۷ ۲-۴-۱-۱۳-۱ باکتریوری
۳۸ ۳-۴-۱-۱۳-۱ عفونت مثانه
۳۸ ۴-۴-۱-۱۳-۱ سندروم حاد مجرا
۳۸ ۵-۴-۱-۱۳-۱ پیلونفریت
۳۹ ۵-۱-۱۳-۱ سپتی سمی
۳۹ ۶-۱-۱۳-۱ سپسیس
۳۹ ۲-۱۳-۱ عفونت های روده ای <i>E.coli</i>
۴۰ ۱-۲-۱۳-۱ نژادهای انتروتوکسیژنیک <i>E.coli</i> (ETEC)
۴۱ ۲-۲-۱۳-۱ نژادهای انتروهموراژیک <i>E.coli</i> (EHEC)
۴۴ ۱-۲-۲-۱۳-۱ تظاهرات بالینی
۴۴ ۳-۲-۱۳-۱ نژادهای انتروپاتوژنیک <i>E.coli</i> (EPEC)
۴۶ ۴-۲-۱۳-۱ نژادهای انترواگرگیتیو <i>E.coli</i> (EAEC)
۴۷ ۵-۲-۱۳-۱ <i>DAEC (Diffusely adherante Escherchia coli)</i>
۴۷ ۶-۲-۱۳-۱ نژادهای انترواینوسو <i>E.coli</i> (EIEC)
۴۹ ۳-۱۳-۱ عفونت های دیگر
۵۰ ۱۴-۱ اپیدمیولوژی
۵۰ ۱۵-۱ پیشگیری

۱۶-۱	درمان	۵۱
۱۷-۱	آنتی بیوتیک های کینولونی	۵۱
۱-۱۷-۱	مقدمه	۵۱
۲-۱۷-۱	ساختار شیمیایی کینولون ها	۵۱
۳-۱۷-۱	تاریخچه	۵۷
۴-۱۷-۱	طبقه بندی	۵۹
۵-۱۷-۱	عملکرد	۶۰
۶-۱۷-۱	کاربرد کینولون ها	۶۳
۷-۱۷-۱	عوارض جانبی	۶۴
۸-۱۷-۱	کسب و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتریها	۶۴
۱-۸-۱۷-۱	مقاومت کروموزومی	۶۶
۲-۸-۱۷-۱	مقاومت پلاسمیدی	۶۶
۳-۸-۱۷-۱	مقاومت ترانسپوزونی	۶۷
۴-۸-۱۷-۱	مقاومت اینتگرون ها	۶۷
۹-۱۷-۱	انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی	۶۸
۱-۹-۱۷-۱	مکانیسم کونژوگاسیون	۶۸
۲-۹-۱۷-۱	مکانیسم ترانسداکشن	۶۹
۳-۹-۱۷-۱	مکانیسم ترانسفورماسیون	۶۹

۱۷-۱۰-۱ مقاومت به کینولون ها.....	۷۰
۱۷-۱۰-۱ مکانیسم های مقاومت به کینولون ها.....	۷۱
۱۷-۱۰-۱-۱ تغییر در مولکول هدف.....	۷۱
۱۷-۱۰-۱-۲ موتاسیونی که تجمع دارو را کاهش می دهد.....	۷۴
۱۷-۱۰-۱-۳ مقاومت ناشی از ژن های پلاسمیدی.....	۷۷
فصل دوم: مروری بر مطالعات.....	
فصل سوم: مواد و روش ها.....	
۳-۱ اهداف و فرضیات.....	۸۰
۳-۱-۱ هدف اصلی.....	۸۴
۳-۱-۲ اهداف فرعی.....	۸۵
۳-۱-۳ اهداف کاربردی.....	۸۵
۳-۱-۴ فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش.....	۸۶
۳-۲ مواد و روش ها.....	۸۶
۳-۲-۱ نوع مطالعه.....	۸۶
۳-۲-۳ تعداد نمونه و روش نمونه گیری.....	۸۶
۳-۲-۴ تست های بیوشیمیایی.....	۸۹
۳-۲-۵ الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی.....	۹۰
۳-۲-۶ تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) با روش آگار دایلوژن.....	۹۲
۳-۷ مقاومت سطح بالا و پایین بر اساس دیسک دیفیوژن و آگار دایلوژن.....	۹۵

۳-۸	بررسی مولکولی مقاومت به فلئوروکینولون ها	۹۵
۳-۸-۱	استخراج	۹۶
۳-۸-۲	آماده سازی پرایمر	۹۷
۳-۸-۳	PCR	۹۸
۳-۸-۴	الکتروفورز محصولات PCR	۱۰۰
۳-۹	تعیین توالی	۱۰۲
فصل چهارم: نتایج و یافته ها		۱۰۳
۴-۱	جمع آوری نمونه	۱۰۴
۴-۲	الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی	۱۰۵
۴-۲-۱	مقاومت سطح بالا و سطح پایین	۱۰۷
۴-۳	نتایج حاصل از MIC در ایزوله های <i>E.coli</i> غیر حساس به سیپروفلوکساسین	۱۰۸
۴-۴	نتایج حاصل از جداسازس ژن های <i>qnr</i>	۱۱۰
۴-۵	نتایج حاصل از تعیین توالی	۱۱۴
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری		۱۱۶
۵-۱	بحث	۱۱۷
۵-۲	نتیجه گیری	۱۲۳
۵-۳	پیشنهادهات	۱۲۴
	منابع و ماخذ	۱۲۵
	ضمیمه	۱۳۷
	چکیده انگلیسی	۱۳۹

فهرست جداول

جدول ۱: تست های بیوشیمیایی افتراقی گونه های جنس اشرشیا.....	۳۱
جدول ۲: پاتوتایپ های مختلف <i>E.coli</i> که عامل گاستروانتریت هستند.....	۴۹
جدول ۳: نسل های کینولون ها.....	۶۰
جدول ۴: موتاسیون در آمینو اسیدهای GyrB ,GyrA.....	۷۳
جدول ۵: موتاسیون در زیر واحدهای ParC و ParE سویه های <i>E.coli</i> مقاوم به کوئینولون.....	۷۴
جدول ۶: پمپ های افلاکس مسئول مقاومت در باکتری های گرم مثبت.....	۷۶
جدول ۷: پمپ های افلاکس مسئول مقاومت در باکتری های گرم منفی.....	۷۶
جدول ۸: جدول متغیرها.....	۸۷
جدول ۹: تفسیر نتایج MIC سیپروفلوکساسین.....	۹۴
جدول ۱۰: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR.....	۹۸
جدول ۱۱: مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix یک واکنش PCR.....	۹۸
جدول ۱۲: مواد مولکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR.....	۹۹
جدول ۱۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر در واکنش PCR برای ژن های مورد نظر.....	۱۰۰
جدول ۱۴: فراوانی ایزوله های <i>E.coli</i> جدا شده بر اساس نوع نمونه های بالینی جدا شده از بیماران.....	۱۰۵
جدول ۱۵: توزیع فراوانی ایزوله های <i>E.coli</i> به تفکیک بیمارستان ها.....	۱۰۵
جدول ۱۶: حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های <i>E.coli</i> جمع آوری شده از بیمارستان های مورد مطالعه.....	۱۰۶
جدول ۱۷: بررسی سطوح مقاومتی به کینولون های بکار رفته در این مطالعه.....	۱۰۷
جدول ۱۸: تعداد ایزوله های غیر حساس به کینولون به تفکیک شهر.....	۱۰۸

جدول ۱۹: فراوانی ژن های <i>qnr</i> در ایزوله های <i>E.coli</i> جداسازی شده در این مطالعه.....	۱۱۰
جدول ۲۰: بررسی سطوح مقاومتی به کینولون ها و حضور ژن های <i>qnr</i> بر اساس مقادیر MIC	
سیپروفلوکساسین.....	۱۱۲
جدول ۲۱: بررسی سطوح مقاومتی و حضور ژن های <i>qnr</i> بر اساس دیسک های نالیدیکسیک اسید و	
سیپروفلوکساسین	۱۱۴
جدول ۲۲ : غلظت های مختلف از محلول مک فارلند.....	۱۳۸
نمودار ۱: نتایج حاصل از MIC در ایزوله های <i>E.coli</i> غیر حساس به سیپروفلوکساسین در این مطالعه	
.....	۱۰۹
نمودار ۲: مقایسه MIC سیپروفلوکساسین با ایزوله های <i>E.coli</i> حامل ژن <i>qnr</i>	۱۱۳

فهرست اشکال

شکل ۱: نمای شماتیک <i>E.coli</i> در رنگ آمیزی گرم.....	۹
شکل ۲ : کلنی ها <i>E.coli</i> روی محیط مک کانکی و نوترینت آگار.....	۱۱
شکل ۳ : ساختار دیواره سلولی <i>E.coli</i>	۱۴
شکل ۴ : پاتوژنز خارج روده ای <i>E.coli</i> بیماریزا.....	۳۳
شکل ۵ : مکانیسم پاتوژنز سویه های <i>ETEC</i>	۴۱
شکل ۶ : مکانیسم پاتوژنز <i>EPEC</i> و <i>EHEC</i>	۴۵
شکل ۷ : مکانیسم پاتوژنز <i>EAEC</i> و <i>DAEC</i>	۴۷

شکل ۸: مکانیسم پاتوژنز <i>EIEC</i>	۴۸
شکل ۹: ساختمان شیمیایی کینولون ها.....	۵۴
شکل ۱۰: ساختار پایه و شاخه های جانبی کینولون	۵۵
شکل ۱۱: ساختار چند آنتی بیوتیک از خانواده کینولون ها.....	۵۷
شکل ۱۲: تهیه سوسپانسیون میکروبی و کشت روی محیط مولر هیتون آگار.....	۹۲
شکل ۱۳: پودر MIC سیپروفلوکساسین.....	۹۴
شکل ۱۴: دستگاه میکروسانتریفیوژ مورد استفاده در مطالعه حاضر.....	۹۷
شکل ۱۵: دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور آمریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر	۱۰۰
شکل ۱۶: تانک الکتروفورز مورد استفاده در مطالعه حاضر	۱۰۱
شکل ۱۷: دستگاه Gel-Documentation مورد استفاده در مطالعه حاضر.....	۱۰۱
شکل ۱۸: واکنش های بیوشیمیایی جنس <i>E.coli</i>	۱۰۴
شکل ۱۹: نتایج به دست آمده از ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها به روش دیسک دیفیوژن آگار	۱۰۷
شکل ۲۰: نتایج MIC در ایزوله های <i>E.coli</i> جداسازی شده در این مطالعه.....	۱۰۹
شکل ۲۱: نتایج PCR از نظر حضور ژن <i>qnrB4</i>	۱۱۱
شکل ۲۲: نتایج PCR از نظر حضور ژن <i>qnrS</i>	۱۱۱
شکل ۲۳: تعیین توالی ژن <i>qnrS1</i>	۱۱۴
شکل ۲۴: تعیین توالی ژن <i>qnrB4</i>	۱۱۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱ بیان مسئله

Escherichia coli (*E.coli*) به عنوان یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه، از گروه باسیل های گرم منفی بی هوازی اختیاری می باشند، این باکتری از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی در ICU به شمار می رود (۱،۲). عفونت های بیمارستانی یکی از مشکلات مهم و اساسی مراکز بیمارستانی می باشد که سبب افزایش مرگ و میر و همچنین افزایش هزینه های درمانی می گردد. بنابراین این عفونت ها یکی از مهمترین چالش های است که بخش مراقبت های ویژه (ICU)^۱ با آن مواجه است. این عفونت ها در بیماران بستری در ICU تقریباً ۳ برابر بیشتر از سایر بخش های بیمارستان می باشد (۵-۱). این ارگانیزم شایعترین علت ایجاد عفونت های مجاری ادراری و همچنین یک پاتوژن مهم در مننژیت نوزادان و عفونت های تنفسی و سپسیس در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان بویژه بخش مراقبت های ویژه می باشد. مقاومت انتی بیوتیکی در بین سویه های *E.coli* بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتورهای مقاومت متعدد می باشد (۴،۶،۷).

فلئوروکینولون ها داروهایی هستند که به طور وسیع برای درمان اولیه باکتری های گرم منفی و بیماریهای عفونی که توسط باکتری های روده ای از جمله *E. coli* ایجاد می شود، استفاده می شود (۸). اما به دلیل استفاده از این داروها میزان مقاومت نسبت به فلئوروکینولون ها در ایزوله های *E.coli* اکتسابی از بیمارستان ها و جامعه به طور چشمگیری روز به روز افزایش پیدا کرده است. تاکنون سه نوع مقاومت کینولونی به واسطه پلاسמיד ها کشف شده که شایع ترین آن ها در خانواده انتروباکتریاسیه می تواند از طریق مجموعه

^۱ Intensive care unit :ICU

ژن های پلاسمیدی *qnr* شامل *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* ایجاد شود (۹). این ژن ها پروتیین های پتاپتیدی را کد می کند که عملکرد کینولون ها بر روی DNA ژیراز و توپوایزومراز IV باکتری را متوقف می کند (۱۰). به همین دلیل حداقل غلظت مهاری (MICs) کینولونها را ۴ تا ۱۲۸ برابر افزایش می دهند (۱۱). هم چنین آنزیم های *aac(6')Ib-cr* که وارسته ای از آمینو گلیکوزید استیل ترانسفراز هستند نیز در غیر فعال سازی آنزیمی فلئوروکینولون ها نقش دارند (۹).

در صورتی که آنزیم های *aac(6')Ib-cr* و ژن *qnr* همزمان موجود باشند میزان مقاومت ۴ برابر بیشتر از حالتی است که هر کدام به تنهایی وجود دارند (۱۲). مطالعات اخیر نشان داده اند که پلاسمید های حاوی ژن های کد کننده Extended spectrum beta-lactamase می توانند همزمان ژن های کد کننده مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها از جمله کینولون ها را نیز با خود حمل می کنند که باعث پیدایش گونه های *E.coli* با مقاومت چند گانه (Multidrug resistant *E.coli*) می شوند که محدودیت های درمانی و مشکلات فراوانی را در ریشه کنی این ارگانیسم ها در بیمارستان را ایجاد کرده است (۹).

لذا انتخاب آنتی بیوتیک های مناسب برای درمان و اعمال راهکارهای مناسب کنترل عفونت در بیمارستان ها، شناسایی وضعیت الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این ارگانیسم نسبت به آنتی بیوتیکهای پیشنهادی ^۲CLSI و همچنین بررسی ویژگیهای ژن های کد کننده فاکتورهای مقاومت دارویی ضروری می باشد (۱۳).

هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ایزوله های *E.coli* مقاوم به فلئوروکینولون ها به واسطه پلاسمید های *qnrA*، *qnrB*، *qnrB4* و *qnrS* در ایزوله های بالینی *E.coli* بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان های آموزشی شهرهای قزوین، کرج و تهران می باشد.

۲-۱ انتروباکتریاسه

خانواده انتروباکتریاسه بزرگترین مجموعه ی باسیل های گرم منفی، هوازی و بی هوازی اختیاری و بدون اسپور و اکسیداز منفی هستند که اهمیت بالینی زیادی دارند. جنس های موجود در این خانواده براساس ساختار بیوشیمیایی، ساختمان آنتی ژنی، هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک و توالی RNA ریبوزومی ۱۶S طبقه بندی می شوند که بیش از ۱۱ دسته^۳، ۴۸ جنس^۴ و صدها گونه^۵ و هزاران زیر گونه^۶ در این خانواده شناسایی شده است که فقط ۲۰-۲۵ گونه از آنها در بیماریزایی انسان اهمیت دارند (طبقه بندی کامل جنس و گونه و زیر گونه های شناسایی شده در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser ارائه شده است). ارگانیسم های این گروه در شکل فلور طبیعی و یا به عنوان پاتوژن در روده مهره داران حضور دارند، بنابراین آنها غالباً بیماریزای روده ای نیستند، بلکه در شکل کومنسال یا ساپروفیت حضور دارند. اما هنگامی که اختلالی در سیستم ایمنی میزبان وجود داشته باشد در شکل فرصت طلب در هر نقطه ای از بدن می توانند ایجاد عفونت کنند. برخی از جنس های این خانواده مثل *Shigella*، *Salmonella* و *Yersenia* همیشه مرتبط با بیماری هستند و جز پاتوژن های روده ای می باشند. باکتری های متعلق به این خانواده می توانند گیاهان، خاک و آب را آلوده سازند. آن ها بسیاری از بیماری های بالینی از قبیل آبسه، پنومونی، مننژیت، سپتی سمی و عفونت های اداری را باعث می شوند. جنس های این خانواده بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار آنتی ژنی و ترادف یابی اسیدهای نوکلئیک طبقه بندی شده اند. تمامی اعضای این خانواده به غیر از گونه های *Klebsiella* و *Shigella* به دلیل داشتن فلاژل پری تریش متحرک می باشند در اغلب اعضای این خانواده پیلی یا فیمبریه وجود دارد که از آن برای اتصال به سلولهای میزبان استفاده می کنند و در برخی از اعضای این خانواده لایه لعابی یا شبه کپسولی وجود دارد. باکتری های متعلق به این

Cluster^۳
Genera^۴
Species^۵
Sub Species^۶

خانواده در محیط آگار خوندار و یا آگار غذائی ساده رشد می‌کنند، می‌توان از محیط‌های انتخابی که حاوی نمک‌های صفراوی و یا رنگ‌هایی مثل آئوزین، متیلن‌بلو و بریلیانت‌گرین می‌باشند و مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت می‌شوند، برای جداسازی آن‌ها استفاده نمود. محیط‌های کشت مک کانکی^۷ حاوی چند قند قابل تخمیر از جمله لاکتوز و معرف‌های رنگی می‌باشد به همین دلیل باکتری‌هایی که لاکتوز را تخمیر می‌کنند کلونی‌هایی به رنگ قرمز ایجاد می‌کنند، بنابراین گونه‌های *E.coli*, *Enterobacter* و اغلب گونه‌های جنس *Klebsiella* حاوی کلونی‌های تخمیرکننده لاکتوز هستند اما پاتوژن‌های روده‌ای *Salmonella* و *Shigella* توانایی تخمیر لاکتوز را ندارند و کلونی‌های بی‌رنگ ایجاد می‌کنند (۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸).

۳-۱ تاریخچه

E.coli اولین بار به وسیله ی پزشکی آلمانی به نام تئودور اشریخ^۸ در طی مطالعاتش بر روی فلورنرمال روده اطفال، شناسایی شد. او در سال ۱۸۸۵، آن ارگانیزم را باکتریوم کلی^۹ نامید و آن را به عنوان عامل بیماری زای اصلی عفونت‌های روده ای و برخی از عفونت‌های خارج روده ای معرفی کرد. نام باکتریوم کلی به طور وسیع تا سال ۱۹۱۹ استفاده می‌شد تا وقتی که کاستلانی^{۱۰} و کالمرز^{۱۱} جنس اشریشیا را تعریف کردند و نام *E.coli* را پایه نهادند (۱۷).

E.coli ارگانیزمی است که به شدت از جنبه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. در باکتریولوژی عمومی به عنوان ارگانیزم مدل برای مطالعه ی ساختار سلولی، رشد و متابولیسم استفاده می‌شود، بعدها از

^۷ MacConkey agar

^۸ Theodor Escherich

^۹ *Bacterium coli*

^{۱۰} Castellani

^{۱۱} Calmers

آن در روش‌های کلونینگ استفاده شده است. *E.coli* به عنوان ارگانیسم کنترل جهت انجام آزمایش‌های کنترل موثر بودن عوامل ضد میکروبی و مواد ضد عفونی کننده استفاده می شود و به عنوان ارگانیسم اندیکاتور جهت تعیین آلودگی مدفوعی مواد غذایی، آب و محیط مطرح می باشد و نقش مهمی را به عنوان فلور میکروبی روده ی انسان و حیوانات خونگرم تشکیل می دهد (۱۷، ۱۸). برای اولین بار طبقه بندی *E.coli* بر اساس تیپ های متنوعی از آنتی ژن سوماتیک O توسط کافمن^{۱۲} در سال ۱۹۴۰ انجام گرفت. محققین چندین گونه برای اشرشیا در نظر گرفتند که به شرح زیر است: *E.fergusonii*^{۱۳}، *E.hermannii*^{۱۴}، *E.albertii*^{۱۵}، *E.coli*^{۱۶}، *E.vulneris*^{۱۷}، که در میان آن ها *E.coli* از نظر پزشکی حائز اهمیت می باشد. ما این گونه ها را بر اساس واکنش های بیوشیمیایی می توانیم از هم تشخیص دهیم (۱۷).

E.albertii به وسیله جان آلبرت و همکارانش در مرکز تحقیق بین المللی بیماران اسهالی در بنگلادش کشف شد. این پاتوژن در ارتباط با پاتوژن های اسپورادیک در میان انسان و پرندگان می باشد. بعضی وقت ها تشخیص این گونه از سویه های *E.coli* تولید کننده سم شبه شیگلا مشکل می باشد (۱۹).

E.hermannii این گونه اولین بار در سال ۱۹۸۲ در زخم و مدفوع حیوانات خونگرم کشف شد (۲۰).

E.fergusonii به عنوان یک گونه جدید از جنس اشرشیا در سال ۱۹۸۵ کشف شد. این ارگانیسم را در خون، مایعات کیسه صفرا، مدفوع و زخم های سطحی شکم تشخیص دادند. *E.vulneris* از زخم جدا کردند (۲۱).

Kauffmann ۱۲

Escherichia fergusonii ۱۳

Escherichia hermanii ۱۴

Escherichia albertii ۱۵

Escherichia coli ۱۶

Escherichia vulneris ۱۷

۱-۴ طبقه بندی

از نظر طبقه بندی *E.coli* در :

Domain: Bacteria

Phylum: Protobacteria

Class: Gamma Protobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Eshershia*

Species: *coli*

قرار دارد (۱۷، ۱۸).

۱-۵ گونه های اشرشیا

۱-۵-۱ *E.coli*

E.coli فلور طبیعی روده کوچک و کولون انسان و حیوان هستند اما در آب و خاک و گیاهان هم یافت می شوند. این ارگانیسم از طریق مدفوع دفع می شود و ممکن است تا مدتی در محیط زنده بماند اما هیچ شواهدی دال بر زندگی مستقل آن در خارج از بدن دیده نشده است. این باکتری غیر بیماری زا می باشد و بخش اعظم باکتری های هوازی روده را تشکیل می دهد، و روده را از عفونت های باکتریایی محافظت کرده و کمک به هضم و تولید مقدار کمی ویتامین K و B12 می نماید با این حال سویه های خاصی از این باکتری تحت شرایط خاص مثلاً با تولید توکسین می توانند بیماری های مختلف را ایجاد کنند یعنی این باکتری می تواند هم به عنوان پاتوژن واقعی و هم به عنوان پاتوژن فرصت طلب در عفونت های روده ای عمل کند. *E.coli* دومین باکتری از لحاظ فراوانی در روده می باشد (بعد از باکترئیدس). بیش از ۸۵٪ عفونت های دستگاه ادراری به ویژه در خانم های باردار به وسیله این ارگانیسم ایجاد می شود. ۵۰٪ عفونت

های بیمارستانی به خصوص پنومونی های بیمارستانی به این ارگانیزم بستگی دارد. این باکتری عامل عفونت زخم و بافت نرم، مننژیت نوزادان و سپتی سمی و باکتری می باشد (۲۲).

۲-۵-۱ *E.albertii*

این گونه به وسیله جان آلبرت و همکارانش در بنگلادش کشف شد (۱۹).

۳-۵-۱ *E. hermannii*

این گونه یک پاتوژن فرصت طلب است و معمولاً تنها در مواردی که میزبان ضعیف شده و یا ضعف سیستم ایمنی دارند ایجاد عفونت کرده که شامل سپتی سمی، ورم ملتحمه چرکی، زخم های دهانی، عفونت های مغزی نوزادان، مننژیت و عفونت زخم می باشد (۲۰).

۴-۵-۱ *E.fergusonii*

این گونه عامل عفونت زخم، باکتری می و عفونت مجاری ادراری می باشد (۲۱).

۵-۵-۱ *E.vulneris*

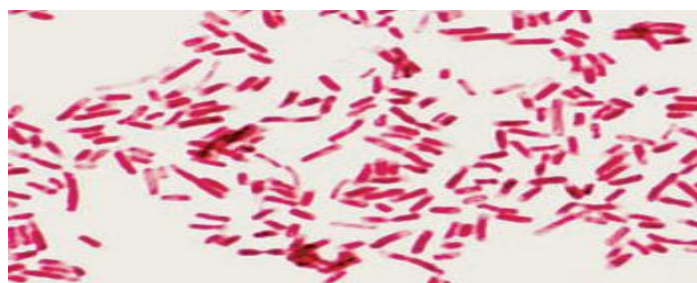
این گونه عامل عفونت زخم می باشد (۲۱).

۱-۶ مرفولوژی اشرشیا

اشرشیا ها باسیل های میله ای شکل گرم منفی با ۴-۲ میکرومتر طول و ۱.۵-۱.۱ میکرومتر عرض هستند که انتهای گرد دارند و به صورت منفرد، زنجیره دوتایی و یا چندتایی قرار می گیرد. جدار سلولی این باکتری ها شامل مورئین لیپوپروتئین^{۱۸}، فسفولیپید^{۱۹} و لیپوپلی ساکارید^{۲۰} است که در واقع ساختمان جدار باکتری های گرم منفی است. لیپوپلی ساکارید دارای زنجیر اختصاصی پلی ساکاریدی است که عهده دار بروز

Morein- Lipoprotein ^{۱۸}
Phospholipid ^{۱۹}
Lipopolysacharid (LPS) ^{۲۰}

خصوصیات پادگنی در گونه های مختلف است. سویه های این باکتری به غیر از *inactive* که بیوواری از *E.coli* می باشد، بقیه متحرک و دارای تازه های پری تریش می باشند. تازه ها از واحد های پروتئینی ساخته شده اند و قطری حدود ۱۹-۲۴ نانومتر دارند. این ارگانسیم ها کپسول یا میکروکپسول های ساخته شده از پلی ساکارید های اسیدی تولید می کنند. *E.coli* انواع متفاوتی از پیلی را تولید می کند که از نظر ساختمانی و خصوصیات آنتی ژنی متفاوت هستند و رشته های پروتئینی مو شکلی هستند که دورتادور باکتری را احاطه کرده اند و گاهی نقش ادهزینی برای باکتری بازی می کند. تقریباً ۸۰ درصد سویه ها دارای فیمبریه، که اغلب از نوع فیمبریه تیپ یک است، می باشند که توان هم‌آگلوتیناسیون و اتصال به سلول های اپی تلیال را داشته و حساس به مانوز هستند گاهی اوقات سویه های موکوئیدی تولید لایه لعابی خارج سلولی می کنند که از جنس پلی ساکاریدی از نوع آنتی ژن K یا از جنس پلی ساکاریدی مشترک در بسیاری از سویه های *E.coli* می باشند. همچنین فاقد اسپور و دانه های گرانولی هستند (۱۷، ۱۴).



شکل ۱: نمای شماتیک *E.coli* در رنگ آمیزی گرم (۱۴)

۷-۱ خصوصیات کشت و بیوشیمیایی اشرشیا

این باکتری ها به خوبی روی محیط های معمولی آزمایشگاهی حاوی یک درصد پپتون به عنوان منبع کربن و نیتروژن رشد می کند. آن ها کموارگانوتروف^{۲۱} هستند و دو نوع متابولیسم تخمیری و تنفسی دارند و در

^{۲۱}Chemoorganotroph

طیف وسیعی از دما رشد کرده اما دمای مناسب برای رشد آن ها ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد. تحت شرایط اپتیمال زمان تکثیر باکتری ۲۰ دقیقه است. اگر توکسین ها، نظیر انتروتوکسین ها و همولیزین ها، در ۳۷ درجه بهترین شرایط برای تولید آن ها می باشد، که به داخل فضای پری پلاسمیک منتقل می گردند. بر اساس لیوپلی ساکارید موجود در غشای خارجی، رشد بر روی محیط جامد به ترتیب به وسیله ی کلنی های صاف و براق یا (S^{23}) و خشک و چین و چروک دار یا خشن (R^{23}) مشخص می شود. بر روی محیط مایع، اشکال S باکتری در عرض ۱۲ تا ۱۸ ساعت به صورت کدورت یکنواخت رشد می کنند، درحالی که اشکال R بطور خودبه خودی به یکدیگر می چسبند و در ظرف محیط کشت مایع رسوب می کنند (۱۴، ۱۷، ۱۸).

E.coli کلنی های مدور، درشت، محدب و بدون پیگمان در سطح نوترینت آگار و بلاد آگار تولید می کند و بعضی از سویه ها، به ویژه سویه های مرتبط با بیماری های مجاری ادراری، در محیط ژلوز خون دار همولیز نوع بتا (β) ایجاد می کنند. سویه های *E.coli* در غلظت های پایین نمک های صفراوی (۵ درصد سدیم دی اکسی کلات) مقاوم هستند و در محیط مک کانکی، به علت تولید لاکتوز به صورت پرگنه های صاف، شفاف، براق و صورتی رنگ رشد می کنند و کلنی های ارغوانی ایجاد می کند (زیرا باکتری از نوع لاکتوز مثبت است و قند را تخمیر کرده و اسید تولید می کند، اسید موجب کاهش pH در محیط آگار مک کانکی شده و در نتیجه رنگ ارغوانی ایجاد می شود. معرف محیط مک کانکی نوترال رد می باشد که در pH زیر ۶/۸ قرمز و در pH بالای ۶/۸ بی رنگ و در pH اسیدی در اثر تخمیر قند صورتی می باشد. همین اتفاق نیز در محیط اتوزین متیلن بلو^{۲۴} رخ داده و کلنی های ارغوانی تیره با جلای سبز فلزی ایجاد می کند. اکثر موارد جدا شده متحرکند و پیگمان تولید نمی کنند پرگنه های این باکتری در محیط دزاکسی کلات سیترات آگار^{۲۵}، کوچک، صورتی و کدر است. این باکتری در محیط براث کدورت ایجاد می کند (۱۴، ۱۷، ۱۸).

Smooth^{۲۲}
 Rough^{۲۳}
 Eosin methylen-blue lactose sucrose agar^{۲۴}
 Deoxycholate citrate agar^{۲۵}



شکل ۲: کلنی‌ها *E.coli* روی محیط مک کانکی و نوترینت آگار (۱۴)

این باکتری در شرایط بی‌هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی‌اکسید کربن را تولید می‌کند. از نظر بیوشیمیایی طیف وسیعی از قندها را تخمیر کرده و فاقد آنزیم سیتوکروم اکسیداز بوده و اکسیداز آن منفی است. آن‌ها باکتری‌های کاتالاز مثبت، احیاء کننده نیتрат (به جز اروینیا^{۲۶}) و بی‌هوازی اختیاری هستند. *E.coli* قادر است از استات به عنوان منبع کربن استفاده کند، اما قادر به استفاده از سیترات^{۲۷} نیست، لذا از محیط سیمون سیترات برای شناسایی آن استفاده می‌شود. این باکتری گلوکز و سایر کربوهیدرات‌ها را تخمیر کرده و پیرووات تولید می‌کند سپس آن را به اسیدهای لاکتیک، استیک و فرمیک تبدیل می‌کند قسمتی از اسیدفرمیک تولید شده، طی سیستم پیچیده هیدروژن لیاز^{۲۸} به مقادیر مساوی از H_2 ، CO_2 تبدیل می‌شود. بیش از ۹۰ درصد از انواع *E.coli* از نظر تولید بتاگلوکورونیداز با استفاده از سوبسترای ۴-متیل‌آمبلی‌فریل‌بتا گلوکورونید (MUG)^{۲۹}، مثبت هستند. *E.coli* نسبت به بسیاری از سویه‌های دیگر خانواده انتروباکتریاسه، نسبت به حرارت مقاومت بیشتری دارد و در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه زنده باقی می‌ماند. این باکتری ممکن است در آب به مدت هفته‌ها یا ماه‌ها زنده بماند اما در مایعات طبیعی خارج از بدن رشد نمی‌کند.

^{۲۶} *Erwinia*

^{۲۷} Citrate

^{۲۸} Hydrogen lyase

^{۲۹} 4-methylumbelliferyl- β -glucuronide

E.coli آنزیم تریپتوفاناز داشته و به همین دلیل اندول تولید می کند تست ^{30}VP آن منفی و ^{31}MR آن مثبت است که این تست در تشخیص این باکتری از آنتروباکترآئروژنز اهمیت فراوان دارد. همچنین این باکتری قادر به تجزیه اوره نمی باشد (۱۴، ۱۷، ۱۸).

۸-۱ ژنتیک

۱- *E.coli* یکی از متنوع ترین گونه های باکتریایی است بطوریکه ۲۰ درصد از ژنوم آن بین سویه های مختلف، مشترک است. *E.coli* برای مدت ها به عنوان ارگانیسم مدل برای مطالعه ژنتیک های باکتریایی به دلایل متعددی استفاده شده است که عبارتند از: ۱- نداشتن احتیاجات غذایی و رشد اختصاصی ۲- دارای تکثیر سریع با زمان تقسیم کوتاه (۲۰ دقیقه) ۳- قابلیت دسترسی آسان و غیربیماریزا بودن آن از دیگر محاسن باکتری می باشد. ژنوم *E.coli* دارای DNA تک کروموزم حلقوی، به طول ۵/۵ mb _ ۴/۵ می باشد. بنابراین این ارگانیسم هاپلوئید است، هر چند یک کپی از بخشی از کروموزوم آن می تواند بر روی پلاسمید های آن حمل شود. این باکتری می تواند با استفاده از مکانیسم هایی مانند ترانسفورماسیون، هم یوغی (کانژوگاسیون) و ترانسداکسیون، ماده ژنتیکی خود را از راه انتقال افقی زن ها به سایر باکتری های مشابه خود منتقل می کنند. *E.coli* معمولاً دارای تعدادی DNA ی حلقوی خارج کروموزومی به نام پلاسمید می باشد. بسیاری از سویه های *E.coli* پلاسمید های خارج کروموزومی را حمل می کنند که می توانند کانژوگاتیو و انتقال پذیر یا غیر قابل انتقال باشند. تیپ دیگری از پلاسمید ها که در ۳۰ درصد از تیپ های وحشی *E.coli* یافت می شود، فاکتور کلیسین^{۳۲} را حمل می کند. کلیسین ها توکسین های هستند که توسط یک باکتری تولید شده و

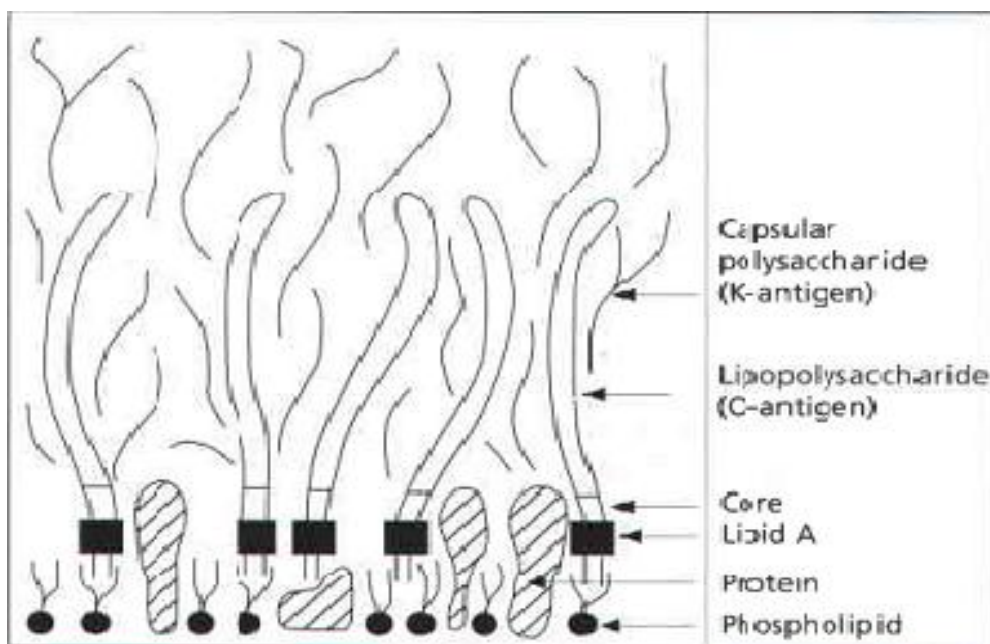
^{۳۰} Voges proskauer
^{۳۱} Methyl red
^{۳۲} Colicins

باکتری های دیگر را می کشند. حداقل ۲۰ تیپ مجزا از پلاسمید های کلیسین که برخی از آن ها انتقال پذیر هستند، در سویه های *E.coli* یافت شده است (۱۷).

۹-۱ ساختار آنتی ژنیک و دیواره سلولی *E.coli*

ساختار های سطح سلولی *E.coli* توسط کافمن برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ به وسیله روش های سرولوژیکی شناسایی شد. کافمن آنتی ژن های سطحی مختلف را بر اساس روشهای سرولوژی و فیزیکی متفاوت از یکدیگر مجزا نمود و آن ها تحت عنوان آنتی ژن های A، B و L نامگذاری کرد. در شکل ۳ ساختار دیواره سلولی *E.coli* نشان داده شده است، که شامل غشاء خارجی فسفولیپیدی، لیپید A موجود در لیپوپلی ساکارید^{۳۳} یا LPS، پروتئین هایی که توسط پلی ساکارید های کپسولی^{۳۴} (CP) پوشانده شده است. LPS و CP هر دو به ترتیب اساس شیمیایی آنتی ژن های O و K می باشند، هر دو در پاتوژنیسته ارگانیسم مشارکت دارند. LPS و CP در غشاء سیتوپلاسمی باکتری سنتز شده واز آنجا به غشاء خارجی منتقل شده اند. از آنجائیکه CP بیشتر به صورت کپسول باکتریایی ترشح شده، بنابراین LPS از طریق پیوندهای هیدروفوبیک در داخل دیواره سلولی باکتری باقی می ماند و ادغام می گردد (۱۷).

^{۳۳} Lipopolysaccharide
^{۳۴} Capsular polysaccharide



شکل ۳: ساختار دیواره سلولی *E. coli* (۱۷)

سه نوع آنتی ژن سطحی بطور گسترده برای تعیین سروتیپ ارگانیزم های انتریک استفاده می شوند که شامل آنتی ژن های سوماتیک^{۳۰} (آنتی ژن O)، آنتی ژن کپسولی (آنتی ژن K) و آنتی ژن تازکی (آنتی ژن H) می باشند. آنتی ژن های فیمبریه ای (آنتی ژن F)، نیز جزء آنتی ژن های سطحی است که در برخی از سروتیپ ها یافت می شود (۱۷).

۱-۹-۱ آنتی ژن سوماتیک یا آنتی ژن O

آنتی ژن O بخشی از LPS جدار باکتری است. LPS از سه ساختار مشخص تشکیل شده است:

۱-۹-۱-۱ هسته مرکزی پلی ساکاریدی، که یک قند ۸ کربنی به نام کتودزاکسی اوکتونات است و به آنتی

ژن اختصاصی O متصل می شود (۱۴، ۱۵).

۱-۹-۲-۱ لیپید A که به هسته مرکزی متصل می شود به عنوان قسمت هیدروفوبیک (آب گریز) محسوب می شود و بروز تاثیرات بیولوژیک LPS باکتری های گرم منفی ناشی از این بخش از باکتری است و در واقع اندوتوکسین باکتری محسوب می شود. لیپید A می تواند باعث تب، لوکوپنی، هیپوتانسیون (کاهش فشار خون)، هیپوگلیسمی (کاهش قند خون)، اسیدوز، انعقاد داخل عروقی منتشر (DIC) ^{۳۶} و حتی نهایتاً مرگ شود (۱۴، ۱۵).

۱-۹-۳-۱ آنتی ژن اختصاصی O، که پلیمری از واحد های تکراری الیگوساکاریدی است و به خاطر تفاوت آن در سویه های مختلف، در تعیین سروتیپ حائز اهمیت است. آنتی ژن های O مقاوم به حرارت و الکل هستند و در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲/۵ ساعت هم غیر فعال نمی شوند. آنتی بادی علیه آنتی ژن O اغلب از نوع IgM می باشد. آنتی ژن O در تنوع آنتی ژنتیکی شرکت دارد و باعث القاء پاسخ های سیستم ایمنی میزبان می شود. غربالگری سروگروه های سوماتیک *E.coli* یک روش متداول در شناسایی *E.coli* است. تعداد سروتیپ های آنتی ژن O، از O1 تا O181 می باشد، برخی از این سروتیپ ها خاص بعضی از پاتوتیپ ها (تیپ های بیماریزا) هستند به عنوان مثال، O157:H7، نوعی EHEC است که با تولید توکسین شیگا موجب اسهال خونی می شود. آنتی ژن سوماتیک به عنوان آنتی ژن اختصاصی در هر جنس مطرح می باشد، اما واکنش متقاطع بین جنس های بسیار نزدیک (*Salmonella* با *Citrobacter* و *E.coli* با *Shigella*) شایع می باشد. سروتیپ های شایع در *E.coli* شامل O78:H12، O111:H2، O124:H30 O143:H30 می باشند، که اکثراً موجب اسهال می شوند (۱۴، ۱۵).

۱-۹-۲ آنتی ژن کپسولی یا آنتی ژن K

ماهیت این آنتی ژن در *E.coli* ، پلی ساکاریدی بوده، که با حرارت دادن تغییر یافته ولی در سویه های خاصی از *E.coli* ، پروتئینی می باشد. فیمبریه های K_{۹۹} و K_{۸۸} جدا شده از حیوانات نمونه هایی از آنتی ژن های K غیر پلی ساکاریدی هستند (۱۴، ۱۵).

در مجموع تعداد محدودی از سویه های *E.coli* دارای کپسول می باشند. آنتی ژن های A، B و L در بیرون از جدار باکتری و آنتی ژن O وجود دارند. در این میان باکتری های واجد آنتی ژن نوع A کپسول دار هستند و باکتری های واجد آنتی ژن های نوع B و L تنها در محیط قند دار و در دمای ۲۰-۱۵ درجه سانتیگراد می توانند کپسول تولید کنند. در سویه هایی از *E.coli* که آنتی ژن K₁ را دارند اغلب در مننژیت نوزادان یافت می شود. آنتی ژن K همچنین در عفونت های روده ای یا ادراری ناشی از *E.coli* دیده شده است. هم اکنون حدود ۱۸۰ آنتی ژن متفاوت K برای *E.coli* شناسایی شده است (۱۴، ۱۵). آنتی ژن K به طور معمول برای تیپ بندی سویه ها استفاده نمی شود، اما از این جهت اهمیت دارد که ممکن است در تشخیص آنتی ژن O اختلال ایجاد کند ، آنتی ژن K ۹۱ گروه دارد و از K₁-K₉₁ طبقه بندی شده است. آنتی ژن K دو گروه جداگانه دارد گروه I شامل کپسول پلی ساکاریدی ۱۰۰ کیلو دالتون می باشد که تنها با برخی از گروه های آنتی ژن O که شامل O₂₀, O₈, O₉ و گروه O₁₀₁ می باشد، یافت می شود. در حالی که گروه II در ارتباط با بیماری های خارج روده ای و زیر ۵۰ کیلو دالتون می باشد و این گروه با توجه به اجزای اسیدی خود شبیه باکتری های گرم مثبت می باشد (۱۴، ۱۵).

۱-۹-۳ آنتی ژن تازکی یا آنتی ژن H

آنتی ژن های تازکی، از جنس اسید آمینه و به صورت پروتئینی به نام فلاژلین دیده می شود و همچنین حساس به حرارت می باشند این آنتی ژن را توسط فرمالین از *E.coli* به دست می آورند. آنتی بادی علیه آنتی ژن H اغلب از نوع IgG است. آنتی ژن H دو نوع است ۱- آنتی ژن فاز I که مخصوص یک نوع باکتری می باشد و به آن آنتی ژن اختصاصی یا آنتی ژن تیپ نیز می گویند. ۲- آنتی ژن فاز II که بین چند

باکتری مشترک هستند و به آن آنتی ژن غیر اختصاصی یا آنتی ژن گروه نیز می گویند. آنتی ژن H از H1-H56 طبقه بندی می شود ولی H13 و H22 در *E.coli* وجود ندارد و H50 همان H10 می باشد. این آنتی ژن توسط ژن *fliC* کد می شود (۱۵، ۱۴).

۱-۹-۴ آنتی ژن فیمبریه ای یا آنتی ژن F

آنتی ژن های F برای پروسه ادهسین باکتری لازم هستند و جز فاکتورهای مهم ویروالانس باکتری محسوب می شوند. معمولاً در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بیان می شوند آنتی ژن F پروتئین های حساس به حرارت هستند. آنتی ژنهای F با بسیاری از اریتروسیت ها آگلوتینه می شوند که می توان از آنها برای تشخیص استفاده کرد. توانایی هماگلوتیناسیون اکثر سویه های *E.coli* در حضور مانوز (فیمبریه تیپ ۱) کاهش می یابد، علاوه بر این سویه های که منجر به اسهال یا بیماری های خارج روده ای می شوند ممکن است فیمبریه هایی را تولید کنند که قادر به هماگلوتیناسیون در حضور قند مانوز (فیمبریه تیپ ۲) هستند. این آنتی ژن ها به وسیله ی ژن های پلاسمیدی کد می شوند (۱۷).

از آنجا که آنتی ژن F در سروتایپینگ باعث ایجاد واکنش متقاطع می شود بایستی از عدم حضور آن مطمئن شد. به همین دلیل یا از کشت هایی استفاده می شود که باکتری در فاز غیر فیمبریه ای^{۳۷} باشد و یا باکتری به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده می شود تا فیمبریه از بین برود (۱۷).

۱-۱۰ فاکتور های بیماری زایی :

۱-۱۰-۱ ادهزین های فیمبریه ای

ادهزین ها از جمله عوامل ویروالانس می باشد که ممکن است فیمبریه ای یا غیر فیمبریه ای باشند که

در زیر به شرح آن ها می پردازیم:

۱-۱۰-۱-۱ ادهزین X

این ادهزین هترولوگ است و در بیماریزایی *E.coli* در دستگاه ادراری نقش دارد (۲۲،۲۳).

۱-۱۰-۱-۲ ادهزین پیلی تایپ IV

این ادهزین در *E.coli* انتروپاتوژنیک^{۳۸} (*EPEC*) وجود دارد. این فیمبریه با اتصال به مخاط روده

باعث از بین بردن میکروویلی های روده و ایجاد اسهال در کودکان می شود، به این پیلی^{۳۹} pili(BFP)

bundle-forming گفته می شود که در *EPEC* و *E.coli* انترو اگرگیتیو^{۴۰} (*EAEC*) وجود

دارد، این ادهزین مشابه پیلی ویبریوکلره آ و نیسریا می باشد کنترل آن تحت تاثیر ژن های موجود در

کروموزوم یا پلاسمید می باشد (۲۲،۲۳).

۱-۱۰-۱-۳ آنتی ژن های فاکتور کلونیزاسیون^{۴۱} (CFA)

به این آنتی ژن ها، آنتی ژن های سطحی اشرشیا هم گفته می شود که در بعضی از سروتیپ های *E.coli*

وجود دارد. شامل دو نوع CFA/I (فیمبریه حساس به مانوز) این نوع فیمبریه ها با حضور مانوز قدرت

اتصال به گیرنده های خود را از دست می دهند این فیمبریه ها را، فیمبریه تیپ ۱ یا پیلی مشترک^{۴۲} نیز می

نامند زیرا بر روی اکثر سویه های *E.coli* یافت می شوند. این فیمبریه در کلونیزاسیون باکتری در روده و

دهان و دستگاه تناسلی، کلیه و مثانه نقش دارد. و CFA/II (پیلی مقاوم به مانوز) می باشد که شامل

فاکتور های چسبندگی سطحی و فیمبریه ها و ادهسین ها می باشد. *UPEC*^{۴۳} دارای فاکتورهای اتصالی

^{۳۸} Enteropathogenic *Escherichia coli*

^{۳۹} bundle-forming pili

^{۴۰} Enteroaggregative *Escherichia coli*

^{۴۱} Colonization factor Antigens

^{۴۲} Common pili

^{۴۳} Uropathogenic *E. coli*

هستند به نام فیمبریه، که به آنها اجازه می دهد تا به طور موفقیت آمیزی عفونت را آغاز می کنند. آدهسین ها آنتی ژن های فیمبریایی هستند که باکتری را قادر می سازند تا به موکوس روده متصل شود. از آدهسین های معمول موجود در *UPEC* می توان به فیمبریه *P*، فیمبریه *S*، فیمبریه *FIC*^{۴۴}، فیمبریه نوع *I* و خانواده های آدهسین *Dr*^{۴۵} که شامل آدهسین های فیمبریال می باشد، اشاره کرد. این فیمبریه ها، توسط ژن های *afa*، *foc*، *sfa*، *fim*، *pap* در *UPEC* کد می شوند. فیمبریه *S* به عنوان فاکتور همراهی کننده با سروتیپ کپسولی *k1* می باشد در ایجاد مننژیت نوزادی نقش دارد و فیمبریه *P* که گیرنده آن متشکل از دو قند گالاکتوز-گالاکتوز با اتصال ۱-۴ است (شبیه آنتی ژن خونی *p* می باشد). این آنتی ژن ها در *E.coli* انتروتوکسی ژنیک^{۴۶} (*ETEC*) وجود دارد (۲۲-۲۴).

۱-۱۰-۱-۴ AAF (Aggregative Adherence Fim)

که به این فیمبریه، فیمبریه های چسبنده می گویند تاکنون سه نوع فیمبریه چسبنده (*AAF/II*، *AAF/I*)، *AAF/III*) در سویه های *EAEC*^{۴۸} شناسایی شده اند زیر واحد های ساختاری آنها به ترتیب *aggA*، *agg-3*، *aafA* می باشند که روی پلاسمید *PAA* قرار دارند. روی پلاسمید *PAA* تنها ژن یکی از پیلی های چسبندگی می تواند قرار گیرد. تولید *AAF/I* و *AAF/II* نیاز به فعال شدن *aggR* (فاکتور فعال کننده رونویسی) دارد؛ در حالی که نقش *aggR* در تولید *AAF/III* ثابت نشده است. کلون کردن *AAF/I* باعث ایجاد فنوتیپ اگریگیتیو و آگلوتیناسیون گلوبول های قرمز در اشریشیا کلی های غیر بیماری زا شده است (۲۲).

۱-۱۰-۲ آدهسین های غیر فیمبریه ای

Filamentation induced by cAMP^{۴۴}
 Dr Adhesins: Decay-Accelerating Factor Receptor^{۴۵}
Enterotoxigenic Escherichia coli^{۴۶}
 Aggregative Adherence Fim^{۴۷}
 Aggregative Adhesion Fimberia^{۴۸}

از جمله ادهزین های غیر فیمبریه ای اینتیمین^{۴۹}، را می توان نام برد که به وسیله ژن *eae* موجود در *EPEC* و *E.coli* انتروهموراژیک^{۵۰} (*EHEC*) تولید و به سلول باکتری اجازه اتصال به سطح انتروسیت را داده تا بتواند باعث تکثیر فیلامنت اکتین بشود. رسپتور این ادهزین *Tir*^{۵۱} (Translocated intimin rec) می باشد (۲۲،۱۷).

۱-۱۰-۲ اندوتوکسین

ترکیب LPS در دیواره سلولی باکتری های گرم منفی جای دارد، و در اثر مرگ سلول آزاد می شود. فعالیت این توکسین وابسته به لیپید A ، LPS است. نقش اندوتوکسین در بیماری، تب زایی، آسیب آندوتلیالی و به دنبال آن DIC و شوک آندوتوکسیک است. این اثرات اهمیت زیادی در بروز بیماری های سپتی سمیک دارند اندوتوکسین ها عامل اصلی سپسیس هم می باشند ، سپسیس های *E.coli* اغلب در بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری^{۵۲} (UTI) رخ می دهد (۱۵،۱۷،۲۲،۲۳).

۱-۱۰-۳ فلاژل

اکثر باکتری های گرم منفی ضمائی سطحی به نام فلاژله را تولید می کنند که باعث حرکت باکتری می شود. فلاژل از سه قسمت تشکیل می شود: (۱) جسم پایه ای که به عنوان موتور چرخشی عمل می کند. (۲) قسمت رشته ای (فیلامنتوس) که به خارج از باکتری راه پیدا کرده و نیروی محرکه را تامین می کند. (۳) قلاب یا هوک که مسئول اتصال این دو بخش به یکدیگر است (۱۵،۱۷،۲۲).

۱-۱۰-۴ آگزوتوکسین ها

^{۴۹} Intimin
^{۵۰} Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
^{۵۱} Translocated intimin rec
^{۵۲} Agglutination

اثرات پاتولوژیک عفونت های حاصل از *E.coli* های بیماری زا، به غیر از مواردی که مربوط به آندوتوکسین هاست، عمدتاً مربوط به تولید انتروتوکسین ها، وروتوکسین ها^{۵۳} و یا عوامل نکروز کننده^{۵۴} می باشد. برخلاف آنتروتوکسین ها که تنها روی فعالیت عملکردی انتروسیت ها موثرند، وروتوکسین ها و عوامل نکروز کننده ی آسیب های سلولی قابل مشاهده در محل عمل خویش ایجاد می کنند (۱۵، ۱۷، ۲۲).

۱-۱۰-۱-۴-۱ انتروتوکسین

این توکسین پروتئینی می باشد که بر عملکرد دستگاه گاستروانتستینال اثر می گذارند. *E.coli* دارای دو نوع انتروتوکسین است، که توسط سوش های *ETEC* تولید می شود.

۱-۱۰-۱-۴-۱-۱ ST^{۵۵} (Heat-stable enterotoxin)

این توکسین مقاوم به حرارت بوده و به دو شکل ST-I یا STa (که محلول در متانول بوده و با اتصال به گانگلیوزید های GM2 سلول های اپی تلیال روده و تحریک آنزیم گوانیلات سیکلاز ایجاد اسهال می کند). و ST-II یا STb (غیر محلول در متانول بوده) ژن های LT و STa در روی یک پلاسمید هستند و این پلاسمید ژن های CFA (آنتی ژن های فاکتور کلونیزاسیون) را نیز با خود حمل می کند (۲۲، ۲۵).

۱-۱۰-۱-۴-۱-۲ LT^{۵۶} (Heat-labile enterotoxin)

این انتروتوکسین توسط پلاسمید کد می شود و باعث اسهال شبیه ویبریوکلرا می شوند. این توکسین با اتصال به گانگلیوزید های GM1 سلول های اپی تلیال روده و تحریک فعالیت آنزیم آدنیلات سیکلاز به وسیله فعال کردن پروتئین G در غشاء سلول هدف و نهایتاً ترشح مایعات و الکترولیت به فضای روده ایجاد اسهال

^{۵۳} Verotoxins
^{۵۴} Cytotoxic necrotizing factor
^{۵۵} Heat-stable enterotoxin
^{۵۶} Heat-labile enterotoxin

می کند که به آن ^{57}LC (Like-cholera toxin) هم می گویند چون همانند توکسین وبا عمل می کند (۲۲،۲۵).

۱-۱۰-۴-۲ وروتوکسین

این توکسین توسط نژادهای *EHEC* تولید می شود. به علت آن که قادر به کشتن سلول های Vero، که رده ای از سلول های کلیه میمون سبز افریقایی است به نام وروتوکسین معروف شدند البته به دلیل آنکه مشابه نورو توکسین شیگلا دیسانتری هم می باشند به نام Shiga-like toxin هم معروفند. وروتوکسین توسط ژنوم باکتریوفاژ کد می شود. وروتوکسین شامل دو تیپ عبارتند از VT1 و VT2 می باشد که VT2 شامل زیر واحدهای VT2c، VT2d و VT2e است. VT2c، VT2d و VT2e در انسان بیماریزا و VT2e همراه با توکسین VT2d در خوک عامل بیماریزا می باشد. وروتوکسین اثر سیتوتوکسینی بر انتروسیست ها دارد و منجر به اسهال می شود، باعث از بین رفتن شبکه مویرگی روده شده و سندرم همولیتیک اورمی^{۵۸} را ایجاد می کند، که شکل شدیدی از یک بیماری اسهالی است. واین سندرم همولیتیک اورمی (شامل: نارسایی حاد کلیه، کم خونی همولیتیک میکرو انژیو پاتیک، ترومبوسیتوپنی) می گردد. از بین سروتیپهای اشریشیاکلی مولد وروتوکسین شایعترین سروتیپ O157:H7 می باشد. این سوش برخلاف اکثر سوش های اشریشیاکلی نمی تواند سوربیتول را مورد استفاده قرار دهد و در अगर سوربیتول مک کانکی رشد آن منفی استخود وروتوکسین بر دو نوع می باشد:

۱-۱۰-۴-۲-۱ وروتوکسین I (شیگا توکسین)

این توکسین دارای دو ساب یونیت A (The active component) و ساب یونیت B (Receptor-) (binding component) می باشد که ساب یونیت B به $^{59}\text{Gb3}$ (Globotriaosyl ceramide)

^{۵۷} Like-cholera toxin
^{۵۸} Hemolytic uremic syndrome
^{۵۹} Globotriaosyl ceramide

متصل می شود و باعث ورود ساب یونیت A به داخل سلول می شود و سپس ساب یونیت A با شکستن باند N گلیکوزیدی در 28srRNA باعث آزادسازی آدنوزین از موقعیت ۴۳۲۴ و نهایتاً اثر روی EF1 (فاکتور طویل کننده ۱) و متوقف کردن سنتز پروتئین و مرگ سلول می گردد (۱۵،۱۷،۲۶،۲۷).

۱-۱۰-۴-۲-۱ وروتوکسین II

این توکسین از نظر عملکرد مشابه شیگاتوکسین است ولی از لحاظ ساختمانی متفاوت از آن می باشد، به طوری که آنتی بادی علیه شیگاتوکسین قادر به خنثی کردن وروتوکسین I می باشد ولی بر روی وروتوکسین II هیچ اثری ندارد. به طور کلی این فعالیت وروتوکسین باعث تورم مخاط روده بزرگ (کولیت) همراه با خونریزی شدید و سندروم اورمی همولیتیک، نارسایی کلیه، کم خونی همولیتیک و ترومبوسیتوپنی شدید می گردد (۱۵،۱۷،۲۶،۲۷).

۱-۱۰-۴-۳ عامل نکروز کننده سایتو توکسیک (CNF1)^{۶۰}

UPEC، که CNF1 راداراست پلی مرازاسیون F-actin را افزایش می دهد و آلفا همولیزین راستت می کند. اپرون hly تشکیل شده از hly A, B, D سنتز، انتقال وفعال سازی آلفا همولیزین راباعث می شود (۲۲).

۱-۱۰-۵ سیدروفورها

مولکول های متصل به آهن مانند آئروباکتین^{۶۱} و انتروباکتین^{۶۲} به وسیله ی برخی از سویه های بیماری زای *E.coli*، سنتز می گردند. زمانی که میزان آهن در دسترس بافتی پایین باشد، این مولکول ها با اتصال به آهن موجبات ادامه ی حیات باکتری را فراهم می نمایند، زیرا آهن یکی از فاکتورهای رشد مهم و موردنیاز باکتری می باشد، اما آهن یا به صورت متصل به پروتئین می باشد مثل هموگلوبین و میوگلوبین، یا به صورت

^{۶۰} Cyptoxic necrotizing factor

^{۶۱} Aerobactin

^{۶۲} Enterobactin

پروتئین‌های شلاته‌کننده آهن مثل لاکتوفرین‌ها و ترانسفرین‌ها موجود می‌باشد. باکتری‌ها در رقابت با میزبان برای کسب آهن، می‌توانند از سیدروفورها یا ترکیبات شلاته‌کننده آهن (مانند، آئروباکتین و انتروباکتین) بهره گیرند. همچنین باکتری‌ها می‌توانند با تولید همولیزین، آهن موجود در سلول‌های میزبان را آزاد کنند (۱۵، ۱۷، ۲۲، ۲۸).

۱-۱۰-۶ کولیسین

کولیسین که نوعی باکتریوسین تولید شده توسط یک سویه باکتریایی می‌باشد که دارای فعالیت باکتری کشی بر علیه سویه‌های دیگر همان گونه یا گونه‌های بسیار وابسته به آن می‌باشد (۲۲).

۱-۱۰-۷ همولیزین آلفا

آلفا همولیزین‌ها، اگرچه اغلب شاخص مفیدی برای بیماری زایی در سویه‌های خاص *E. coli* است، اما ظاهراً به طور مستقیم با بروز بیماری زایی مشارکت ندارد. عمل آلفا همولیزین میزان دسترسی پاتوژن به آهن را بالا می‌برد. این آنزیم توسط سویه‌های *UPEC* ترشح می‌شود و باعث عفونت مجاری ادراری در خانم‌هایی که تازه ازدواج کردند، می‌شوند که به نام سیستیت ماه عسل معروف است. نژادهای *E. coli* مرتبط با پیلونفریت اکثراً توانایی تولید همولیزین را دارند. همولیزین آلفا نقش مهمی در مهار فاگوسیتوز و مهار کموتاکسی و نیز تولید فاکتور نکروزان دارد، و توکسینی است که باعث آسیب بافتی میزبان و تسهیل انتشار باکتری می‌گردد و در پاتوژنز باکتری‌ها نقش دارد (۲۲).

۱-۱۰-۸ کپسول

بطور کلی سویه‌هایی از *E. coli* که عفونت غیرگوارشی ایجاد می‌کنند کپسول دار هستند. کپسول این باکتری از عوامل مهم بیماری‌زایی به خصوص در مننژیت کودکان می‌باشد. کپسول باعث می‌شود که پاتوژن در مراحل اولیه عفونت از فعالیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی در امان بماند و همچنین ایمونوژن ضعیفی بوده و فعال‌کننده ضعیف کمپلمان می‌باشند (۲۲).

بیان آنتی ژن O, K, H تحت کنترل ژنتیکی ارگانیسم می باشد. هر یک از این آنتی ژن ها می توانند بیان شده یا بیان نشوند (تغییر فاز) و این ویژگی باکتری را در برابر مرگ به واسطه آنتی بادی ها حفاظت می کند (۲۲).

۱-۱۰-۱ سیستم ترشچی نوع III

بسیاری از باکتری ها (مثل شیگلا، سالمونلا، اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک، یرسینیا، سودوموناس^{۶۳}، کلامیدیا) سیستم موثر مشترکی برای آزادسازی فاکتورهای ویروالانس خود به درون سلول های یوکاریوتی هدف دارند. این سیستم، به عنوان سیستم ترشچی نوع ۳ مطرح بوده که همچون سرنگ مولکولی که تقریباً ۲۰ پروتئین دارد امکان انتقال فاکتورهای ویروالانس به داخل سلول های یوکاریوتی هدف را فراهم می کند. اگرچه فاکتورهای ویروالانس و تاثیرات آنها در بین باکتری های میله ای گرم منفی متفاوت است اما مکانیزم انتقال این فاکتورها یکسان می باشد. دیده شده در فقدان سیستم ترشچی نوع ۳، ویروالانس باکتری ها کاهش می یابد (۲۲).

۱-۱۰-۱۱ جزایر پاتوژنیسیته (PAIs)^{۶۴}

PAIs مناطقی در ژنوم هستند که گروه های بزرگی از ژن های ویروالانس در آنجا یافت می شوند، اما در باکتری هایی که پاتوژن نیستند یافت نمی شوند. بسیاری از فاکتورهای ویروالانس موجود در *E. coli* به خوبی آن که روی پلاسמיד و یا پروفاز حمل شوند روی PAI حمل می شوند. جزایر بیماریزایی با نام HPI^{۶۵} کدکننده ی سیستم جذب آهن است. این جزایر در *STE*C^{۶۶}, *EIEC*, *EAEC*, *EPEC*^{۶۷}, *DAEC* نیز حضور دارد (۲۲).

^{۶۳} *Pseudomonas spp.*

^{۶۴} Pathogenicity islands

^{۶۵} High Pathogenicity Islands

^{۶۶} Shiga-like toxin-producing *E. coli* (*STEC* or *SLTEC*)

^{۶۷} Diffusely Adherent *E. coli*

۱۱-۱ روش‌های تایپینگ *E.coli*

روشهای بسیاری برای تایپینگ *E.coli* جهت مطالعه اپیدمیولوژی، انتخاب درمان مناسب، کنترل و پیشگیری عفونت ناشی از این باکتری که دارای اهمیت فراوان می باشد، مورد استفاده قرار گرفته اند. ارزش اپیدمیولوژیکی این روشها به قدرت تفکیک، قابلیت اطمینان و سهولت انجام آنها بستگی دارد (۱۷).

۱-۱۱-۱ فنوتایپینگ^{۶۸}

در این روش ها از بخش های ساختاری میکروارگانیزم برای طبقه بندی آن استفاده می شود از جمله این روش ها می توان به موارد زیر اشاره نمود (۱۷).

۱-۱-۱۱-۱ سروتایپینگ^{۶۹}

سروتایپینگ یکی از متداولترین روشهای فنوتایپینگ بوده که بر اساس حضور آنتی ژن های O، K و H می باشد. بسیاری از سویه های *E.coli* با استفاده از این روش غیرقابل تایپ شدن هستند و انجام آن مستلزم هزینه و صرف زمان است (۱۷).

۱-۱-۱۱-۲ بیوتایپینگ^{۷۰}

اساس این روش طبقه بندی باکتری ها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک آن ها می باشد که متداولترین روش تایپینگ در آزمایشگاه های کوچک است ولی با توجه به استفاده زیاد از محیط های کشت و نیاز به مدت زمان طولانی برای حصول پاسخ، بیوتایپینگ روش مناسبی برای بررسی های اپیدمیولوژیک نبوده و باید با سایر روش ها به صورت همزمان مورد استفاده قرار گیرد. در برخی شرایط، بیوتایپینگ برای تفکیک سویه ها در *E.coli* کافی و مناسب می باشد. علاوه بر بیوتایپینگ روش های دیگری مثل

Phenotyping^{۶۸}
Serotyping^{۶۹}
Biotyping^{۷۰}

رزستوتاایپینگ^{۷۱}، هم آگلوتینین تایپینگ^{۷۲} و کلی سین تایپینگ^{۷۳} می باشد که امروزه روش های مولکولی جایگزین آن ها شده است این روش های فنو تایپینگ نیز توسط کریکتون و اولد در سال ۱۹۸۰ و دیوید و همکاران در سال ۱۹۹۱ توصیه شده اند و نتیجه گیری کرده اند که با ادغام دو روش می توان یک سیستم قابل اطمینانی را به وجود آورد (۱۷).

۱-۱۱-۳ فازتایپینگ^{۷۴}

فازتایپینگ برای سروگروه های *E. coli* O111 و O55 و O26 در اوایل سال های ۱۹۵۰ صورت گرفت. این روش در مورد توزیع سویه های *E. coli* اطلاعات زیادی را فراهم می کند. از معایب فازتایپینگ، عدم دسترسی آسان به سوسپانسیون های فاژی مناسب در آزمایشگاه های روتین می باشد و معمولاً دسترسی به آنها در آزمایشگاه های مرجع فراهم می گردد (۱۷).

۱-۱۱-۴ تایپینگ با آنتی سرم

این روش معمولاً امکان شناسایی سروگروه های *E. coli* O را فراهم می کند که با ویژگی های بیماریزایی خاصی ارتباط دارند. آنتی ژن O برای سروتایپینگ *E. coli* استفاده می شود و این آنتی ژن از O1-O181 طبقه بندی می شوند ولی تعدادی گروهها برای مثال O31, O47, O67, O72, O93(K84), O122 و O94 از این طبقه بندی حذف شده اند و گروههای O174-O181 موقتی هستند و یا در حال بررسی آنها هستند گروه های *STEC/VTEC* O176-O181 هستند (۱۷).

۱-۱۱-۲ روش های مولکولی

^{۷۱} Resistotyping
^{۷۲} Hemagglutinin typing
^{۷۳} Colicin typing
^{۷۴} Phagotyping

اساس این روش ها استفاده از ژنوم میکروارگانسیم ها برای تیپ بندی آن ها می باشد. از این روش ها به صورت گسترده برای تایپینگ سویه های *E.coli* استفاده می شود. این روش ها شامل : RFLP^{۷۵}، FAFLP^{۷۶}، PFGE^{۷۷}، MLST^{۷۸}، VNTR^{۷۹}، RAPD^{۸۰} و SLST^{۸۱}(۱۷).

۱-۱۲ تشخیص آزمایشگاهی

اشرشیا یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسیه است و یک باسیل گرم منفی، هوازی و بی هوازی اختیاری، بدون کپسول و اسپور و اکسیداز منفی می باشد. *E.coli* تنها گونه در این جنس است که در بیماریزایی انسان اهمیت دارد. گونه های اشرشیا را ممکن است از مکان های مختلف یا به صورت فلور نرمال و یا بر اساس بیماری های مختلف مثل عفونت های ادراری، عفونت های گوارشی، عفونت های زخم، مننژیت، سپتی سمی و.... می توان جدا کرد. برای جدا نمودن باکتری از قسمت های استریل بدن (خون و مایعات) از محیط های غیر افتراقی مثل نوترینت، شکلات و بلاد آگار استفاده می کنند ولی برای جدا نمودن باکتری از مکان هایی که احتمال آلوده شدن دو یا چند ارگانسیم وجود دارد (مجاری ادراری، زخم) علاوه بر محیط های قبلی، از محیط های انتخابی EMB یا مک کانکی یا^{۸۲} CLED استفاده می کنند. برای جدا کردن اشرشیا های روده ای ساده ترین روش کشت روی محیط های مک کانکی یا EMB می باشد. البته از سوآب های مقعدی در بیماران بستری استفاده می کنند ولی ارزش چندانی ندارد(۱۶). روش هایی که برای تشخیص اشرشیا وجود دارد شامل موارد زیر است:

-
- Restriction fragment length polymorphism^{۷۵}
 - Flourescennce-based amplified fragment length polymorphism^{۷۶}
 - Pulsed-field gel electrophoresis^{۷۷}
 - Multi locus sequence typing^{۷۸}
 - Variable-number tandem repeat^{۷۹}
 - Random amplification of polymorphic DNA^{۸۰}
 - Single locus sequence typing^{۸۱}
 - Cysteine lysine electrolyte deficient^{۸۲}

۱-۱۲-۱ روش کلاسیک: این روش شامل ۲ مرحله کشت و سرولوژی می باشد و نتایج حاصل از این دو روش در نهایت می تواند منجر به شناسایی سروتیپ خاص موجود در نمونه گردد (۱۶).

۱-۱۲-۱-۱ کشت

در مجموع برای هیچ یک از پاتوتایپ های اشریشیاکلی محیط کشت اختصاصی وجود ندارد و باید ترکیبی از روش های کلاسیک، سرولوژی و مولکولی را برای شناسایی آنها استفاده نموده لذا جهت تشخیص اینگونه سویه ها اطلاعات موجود بیمار از قبیل سن بیمار، نوع اسهال و علائم کلینیکی بیمار می توانند به عنوان عوامل کمکی در تشخیص استفاده شوند، و همچنین رشد اشریشیا کلی در محیط مکانیکی به صورت کلنی های صورتی رنگ حائز اهمیت می باشد (۱۶).

۱-۱۲-۲ سرولوژی

این روش به همراه کشت از محیط نوترینت آگار برای تشخیص آنتی ژن های H و O و تعیین سروتیپ های مختلف موجود در سویه های اشریشیاکلی انجام می گیرد. هر سویه دارای آنتی ژن های سوماتیک (O) و آنتی ژن های تاژکی (H) خاصی می باشند. در این روش سویه ها توسط آنتی سرم های تجارتي O و H شناسایی می شوند (۱۶).

۱-۱۲-۳ روش مولکولی

انجام تست های مولکولی مانند PCR و هیبریداسیون از طریق روش های استاندارد صورت می پذیرد. انجام PCR برای تشخیص مولکولی پاتوتایپ های *E.coli* در آزمایشگاه مرجع کشوری راه اندازی شده است و تشخیص سویه های مشکوک با کمک روش های مولکولی قابل انجام می باشد. آزمایش PCR توسط پرایمرهای خاص که برای ژن های ویروالانس طراحی شده اند بر روی DNA هایی که از سویه های مورد نظر جدا شده اند صورت می پذیرد (۱۶).

۱- تعیین الگوی چسبندگی سویه باکتری به سلول های اپی تلیال

HeLa و HEP- 2

۲- تشخیص نوع توکسین تولید شده توسط سویه های *E.coli* به کمک سلول های فیروبلست مانند سلول های Vero یا CHO ، انجام این تست در تمامی آزمایشگاه ها به علت نبود امکانات و پرسنل متخصص امکان پذیر نمی باشد ولی این روش در آزمایشگاه مرجع کشوری *E.coli* راه اندازی شده و سویه های مورد مطالعه می توانند از این نظر مورد بررسی قرار گیرند (۱۶).

اشرشیاها از نظر فنوتیپی به وسیله تست های بیوشیمیایی متعددی شناسایی می شوند. تست های مفید برای شناسایی و افتراق گونه های اشرشیاها به طور خلاصه در جدول ۱-۱ آمده است. این احتمال وجود دارد که مشکلاتی در جداسازی و شناسایی *E.coli* غیر فعال از شیگلا، از نظر متابولیکی به خاطر شکل های حدواسط شیگلا رخ دهد. شیگلا را توسط تست های آرژنین هیدرولاز، لیزین دکربوکسیلاز و تحرک شناسایی می کنند که همه این تست ها در شیگلا منفی می باشد. همه گونه های اشرشیا اسید و گاز را از تخمیر کربوهیدرات تولید می کنند اما اینوزیتول و D آدینیتول تنها توسط *E.fergusonii* استفاده می شود. تخمیر لاکتوز توسط *E.coli* انجام می شود ولی توسط گونه های دیگر با تاخیر یا صورت نمی گیرد. گونه های اشرشیا در محیط KCN^{۸۳} رشد نمی کنند ولی گونه *E. hermannii* در این محیط رشد می کند. و همه گونه ها فاقد توانایی تولید سولفید هیدروژن می باشند (۱۶). سیترات توسط *E.coli* و *E.vulneris* استفاده نمی شود ولی به مقدار کمی توسط *E.fergusonii* و *E. hermannii* استفاده می شود. لیزین توسط اکثر سوشها دکربوکسیله می شود ولی توسط *E. hermannii* نمی تواند دکربوکسیله شود. اورنیتین توسط همه گونه ها به استثنا *E.vulneris* و تعدادی از سوشهای *E.coli* دکربوکسیله می شود. همه گونه ها به

^{۸۳} Potassium cyanide

استثنا *E. vulneris* اندول مثبت هستند. جنس اشرشیا از نظر تست MR مثبت اند ولی از لحاظ تست VP

منفی می باشند. تست های دیگر که کمک به افتراق بین گونه ها می کند شامل رشد در محیط سیانید پتاسیم

، تولید اسید از D آدنیтол ، D آرابیتول ، سلوبیوز، لاکتوز، D مانیتول و D سوربیتول می باشد(۱۶).

جدول ۱-۱: تست های بیوشیمیایی افتراقی گونه های جنس اشرشیا(۱۶)

Test or property	<i>E. coli</i>		<i>E. fergusonii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. blattae</i>	<i>E. albertii</i>
	Normal	Inactive					
Motility	+	=	+	+	+	-	=
Indole production	+	v	+	+	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	v	+	=	v	+	+
Ornithine decarboxylase	v	v	+	+	-	+	+
Acetate utilization	+	v	+	v	v	-	+
Growth in KCN	-	-	-	+	v	-	-
Yellow pigment	-	-	-	+	v	-	-
Gas produced during fermentation	+	-	+	+	+	+	+
Fermentation of:							
adonitol	-	-	+	-	-	-	-
D-arabitol	=	=	+	=	=	=	=
cellobiose	-	-	+	+	+	-	-
lactose	+	v	-	v	v	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	-	+
mucate	+	v	-	+	v	v	v
D-sorbitol	+	v	-	-	-	-	-
sucrose	v	v	-	v	-	-	-

Normal, typical biochemical reactions; inactive, reactions previously associated with "*Escherichia dispar*"; KCN-, failure to grow in presence of potassium cyanide.

۱-۱۳ بیماریزایی

E. coli در بین گونه های جنس اشرشیا در بیماریزایی انسان بسیار اهمیت دارد. بر اساس ظهور علائم

کلینیکی *E. coli* های پاتوژن به گروه های مختلفی تقسیم می شوند ۱- *E. coli* های پاتوژن روده ای^{۸۴}

۲- *E. coli* های پاتوژن خارج روده ای (ExPEC)^{۸۵}

۱-۱۳-۱ عفونت های خارج روده ای *E. coli*

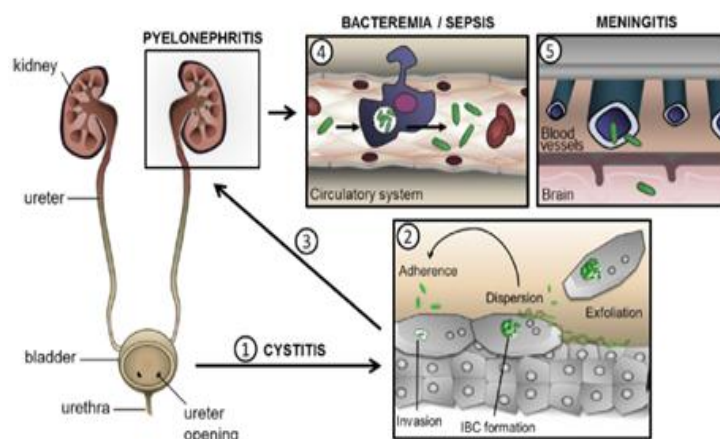
بر خلاف *E. coli* های مسئول بیماری های اسهالی، باکتری های خارج روده ای یا ExPEC باکتری های کومنسال روده ی انسان و حیوانات هستند و تنها وقتی که وارد خون، مایع مغزی و نخاعی یا CSF و مجاری ادراری شوند، به پاتوژن های حاد تبدیل می شوند. سویه های ExPEC منجر به سندرم های کلاسیک مثل UTI، باکتری می یا مننژیت نوزادی می گردند. عفونت های ناشی از ExPEC (شکل ۴) به وسیله ی سه پاتوتیپ مجزا از *E. coli* ایجاد می شوند (۲۹، ۲۲).

۱- *E. coli* یوروپاتوژنیک (UPEC)

۲- سویه های *E. coli* مسئول در مننژیت نوزادی (MAEC)^{۸۶}

۳- سویه های *E. coli* که مننژیت و سپتی سمی ایجاد می کنند.

Intestinal Pathogenic *E. coli*^{۸۴}
Extraintestinal Pathogenic *E. coli*^{۸۵}
Meningitis- associated *Escherichia coli*^{۸۶}



شکل ۴: پاتوژنز خارج روده ای *E. coli* بیماریزا (۲۲).

بیشترین موارد آلودگی به عفونت های غیرروده ای و به خصوص عفونت های ادراری در سالمندان دیده شده است. میزان آلودگی به این باکتری در دهه گذشته دو برابر شده است و سالیانه بیش از ۱۷ هزار مورد ابتلا به این باکتری در بیمارستان ها گزارش می شود. به طور کلی سویه های *E. coli* خارج روده ای عامل عفونت های زیر می باشند (۳۰).

۱-۱۳-۱ عفونت های فرصت طلب

E. coli به عنوان دومین عامل عفونت های بیمارستانی (nosocomial) بعد از استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. شایعترین نوع عفونت های بیمارستانی آن به صورت پنومونی (در افراد بیشتر از ۵۰ سال یا افراد دارای بیماری زمینه ای مزمن) می باشد که اغلب منجر به empyema و sepsis می شود. پنومونی اغلب به وسیله کلونیزاسیون در مجاری تنفس فوقانی (برای مثال نازوفارنکس) ایجاد می شود. پنومونی به دست آمده از جامعه به ندرت گزارش شده است (۲۸،۲۹). پنومونی ناشی از ونتیلاتیو (VAP) ^{۸۷} از شایعترین عفونت اکتسابی در بخش مراقبت ویژه است و میزان شیوع در بیماران انتوبه ۲۱ برابر بیماران دیگر است

^{۸۷} Ventilator- Associated pneumonia

کلونیزاسیون لوله تراشه به عنوان یک عامل خطر محسوب شده و خود تحت تاثیر عواملی نظیر طول مدت انتوباسیون و کاهش اسیدپه معده قرار می گیرد و خطر بیماری به ازای هر روز انتوباسیون اندوتراکئال و ونتیلیاسیون مکانیکی بین ۱-۳٪ افزایش می یابد. علائم پنومونی شامل تب، کاهش تنفس، افزایش میزان تنفس، افزایش ترشحات تنفس می باشد. از یافته های دیگر برونکوپنومونی به خصوص در لوب پایینی در رادیولوژی قفسه سینه می باشد (۳۱).

۱-۱۳-۲ عفونت های داخل شکمی

E. coli نسبت به کلبسیلا و انتروکوک فکالپس یکی از شایع ترین ارگانیزم هایی است که در ارتباط با کوله سیستیت^{۸۸} و کلانژیت^{۸۹} و آبسه های داخل شکمی می باشد. عفونت های داخل شکمی دومین عامل مرگ و میر در بیماران بستری در بخش مراقبت ویژه می باشد. علائم کوله سیستیت و کلانژیت، تب ۳۹ درجه سانتیگراد، درد در یک چهارم قسمت فوقانی در سمت راست (RUQ) Right Upper Quadrant^{۹۰} و زردی در ۷۰٪ موارد مشاهده می شود. در مواردی که بیماری شدت می یابد کاهش فشار خون، گیجی، نارسایی کلیه و ناراحتی کبدی مشاهده می شود که آگه پیشرفت کند ایجاد عفونت مجاری صفراوی می کند (۲۲،۳۲).

۱-۱۳-۳ مننژیت نوزادان (NMEC)

عفونت های اولیه مننژیت نوزادی معمولا از راه انتقال عمودی از مادر و در حین زایمان و افراد مسن و همچنین در افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند به خصوص افرادی که پیوند عضو یا مغز استخوان انجام می دهند، رخ می دهد و یا در موارد نادری از عفونت های بیمارستانی ناشی می شوند. مادامی که باکتریوری در خلال UTI رخ می دهد بخصوص هنگامی که انسداد مجاری ادراری وجود داشته باشد، باکتریوری

^{۸۸} Cholecystitis
^{۸۹} Cholangitis
^{۹۰} Right Upper Quadrant

گسترش یافته و منجر به مننژیت می گردد. در مننژیت های *E.coli* فاکتور اتصال اصلی برای اتصال باکتری به سلول های آندوتلیال مغز، فیمبریه S می باشد. نوزادانی که نارس اند و یا وزن آن ها در هنگام تولد کم است ریسک بالایی برای مننژیت دارند. حدود ۴۰ درصد از موارد مننژیت نوزادان توسط *E.coli* ایجاد می شود و سه چهارم سویه های جدا شده از مننژیت نوزادی توسط نژادهای دارای آنتی ژن کپسولی K1 ایجاد می شود. آنتی ژن K1 این باکتری ها با کپسول پلی ساکاریدی گروه B نایسریا مننژیتیدیس واکنش متقاطع دارد. همچنین *E.coli* و گروه B استرپتوکوک موجب بروز مننژیت نوزادان می شوند. مننژیت در بزرگسالان شایع نیست ولی در افرادی که ترومای مغزی و ضعف سیستم ایمنی دارند به خصوص افرادی که کورتیکو استروئید دریافت می کنند خطر ابتلا به مننژیت را افزایش می دهد (۲۲).

۱-۱۳-۱-۳-۱ تظاهرات بالینی

تظاهرات بالینی در نوزادان مبتلا به مننژیت شامل تب، کاهش رشد و علائم نورولوژیک غیر طبیعی، زردی و بی اشتهایی می باشد. نوزادان کمتر از ۱ ماه دارای علائم بیحالی، استفراغ، کج خلقی و بی اشتهایی و در بیماران بیشتر از ۴ ماه سفتی گردن و تب و در افراد بزرگسال مبتلا به مننژیت حاد سردرد شدید، استفراغ، گیجی، بیحالی و تب می باشد. تشخیص افتراقی مننژیت حاد در *E.coli* شامل سپسیس، آبسه های مغزی و کزاز نوزادان می باشد (۲۲).

۱-۱۳-۱-۴ عفونت دستگاه ادراری (UTI)^{۹۱}

عفونت های ادراری (UTI) یکی از شایع ترین عفونت ها در بیماران سرپایی و یا بستری در بیمارستان محسوب می شود. سالیانه حدود ۱۵۰ میلیون نفر در دنیا به UTI مبتلا می شوند، در ایالات متحده آمریکا (USA) هر ساله ۱/۶ میلیارد دلار هزینه صرف درمان این عفونت ها می گردد از لحاظ شیوع، رتبه دوم را پس از عفونت های تنفسی داشته و در بزرگسالان رتبه اول بیماری های عفونی بزرگسالان تشکیل

^{۹۱} Urinary tract infection: UTI

می دهند و تحت تأثیر جنسیت و سن قرار دارد. به این ترتیب اهمیت عفونت های ادراری از نظر عوارض بسیار جدی که در نتیجه عدم تشخیص درمان مناسب بر جای می گذارد بر کسی پوشیده نیست (۳۳). *E.coli* ، باکتری غالب در ایجاد عفونت ادراری در بیمارستان ها و جامعه محسوب می شود. علت حدود ۴۰ درصد عفونت های بیمارستانی عفونت ادراری است و سوند گذاری مثانه عامل مساعد کننده ی بروز این عفونت است. حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد بیماران در بیمارستان ها سوند گذاری مثانه می شوند و اغلب بیمارانی که بیش از ۱۵ روز سوند ادراری داشته اند، دچار باکتریوری می شوند این عفونت ها، بیشتر در بیمارانی که دارای نقص سیستم ایمنی اند یا تحت درمان پزشکی و جراحی قرار گرفته اند، همچنین افراد سالخورده و کسانی که درمان های تهاجمی دریافت نمودند و یا از ایمپلنت ها و اندام های مصنوعی استفاده می کنند، دیده می شوند ریسک فاکتور های دیگر UTI شامل کاتتر، دستگاه های مکانیکی ، انسداد مجاری ادراری و دیابت می باشد. UTI که در ارتباط با *E.coli* می باشد حدود ۸۰-۷۰٪ عفونت ها را تشکیل می دهد. عفونت های ادراری براساس تظاهرات بالینی، میزان تهاجم به بافت، شرایط اپیدمیولوژیک، و احتیاج به درمان آنتی بیوتیکی، متفاوت می باشد. ۵ نوع اصلی عفونت ادراری وجود دارد: اورتریت،^{۹۲} باکتریوری بدون علامت،^{۹۳} عفونت مثانه،^{۹۴} سندرم حاد مجرای^{۹۵} و پیلونفریت^{۹۶}. *UPEC* مسئول ۹۰٪ عفونت مجاری ادراری در کشورهای توسعه یافته است. در عفونت های بالارونده باکتری های مدفوعی در پیشابراه کلونیزه می شوند و در مجاری ادراری گسترش یافته و به مثانه و کلیه می رسند و ایجاد پیلونفریت و یا پروستات در مردان می کنند. سوبه هایی که باعث پیلونفریت می شوند، با آنتی ژن K و نوع خاصی از پیلی یعنی پیلی P یا Pap در ارتباط می باشند، این پیلی از فاکتورهای ویروالانس مهم در سوبه های *UPEC* محسوب می گردد. *UPEC* همچنین توکسین های

^{۹۲}Urethritis

^{۹۳}Asymptomatic bacteriuria

^{۹۴}Cystitis

^{۹۵}Acute Urethral Syndrome

^{۹۶}Pyelonephritis

^{98}Sat ، ^{99}Cft و همولیزین را تولید می کند. زنان چون پیشابراه کوتاهتری نسبت به مردان دارند ۱۴ برابر بیشتر از مردان از UTI رنج می برند (۳۳). *UPEC* به دلیل داشتن عوامل چسبنده غیر فیمبریه ای *AFAI* و *AFAIII* و پیلی *p* به قسمت های مختلف مثانه و قسمت فوقانی مجاری ادراری می چسبند و با تولید آلفا و بتا همولیزین باعث لیز سلول های مجاری ادراری می گردد (۳۶-۳۳). گیرنده پیلی *D p* گالاتوز-*D* گالاتوز می باشد، که مشابه آنتی ژن گروه خونی *p* در اریتروسیت می باشد. کمتر از ۱٪ افراد کمبود این گیرنده را دارند. فاکتور دیگری که در سیستمیت و پیلونفریت در خانم های باردار نقش دارد تحت عنوان *of Dr family adhesins* می باشد. این آدهیزین به سلول های گروه خونی *Dr* متصل می شود و در *DAF* (decay accelerating factor) در اریتروسیت و دیگر سلول ها وجود دارند (۳۴، ۳۳).

با توجه به افزایش خطر *UTI* در نوزادان، زنان باردار، افراد سالخورده، بیماران با آسیب های نخاعی، متعاقب استفاده از سوند ادراری، بیماران مبتلا به دیابت، مولتیپل اسکلوئزیس و بیماران دچار نقص ایمنی درمان اولیه و کنترل بیماری دارای اهمیت خاصی است (۳۳).

۱-۱۳-۱-۴-۱ اورتریت

علائم مربوط به اورتریت (عفونت مجرا)، سوزش و تکرر ادرار می باشد. اورتریت عفونتی رایج و منتقله از راه جنسی می باشد. از عوامل شایع ایجادکننده اورتریت می توان به کلامیدیا تراکوماتیس،^{۹۹} نایسریا گنوره^{۱۰۰} و تریکوموناس واژینالیس^{۱۰۱} اشاره نمود (۱۶).

۱-۱۳-۱-۴-۲ باکتریوری بدون علامت

^{۹۷} Cytotoxic necrotizing factor-1

^{۹۸} Secreted autotransporter toxin

^{۹۹} Chlamydia trachomatis

^{۱۰۰} Neisseria gonorrhoea

^{۱۰۱} Trichomonas vaginalis

باکتریوری بدون علامت، جداسازی باکتری با شمارش مشخص از نمونه ادراری می‌باشد که طی یک نمونه-گیری صحیح، از فرد فاقد علائم عفونت ادراری گرفته شده باشد. باکتریوری بدون علامت، نسبتاً شایع است اما بسته به سن، جنس و وجود ناهنجاری دستگاه ادراری- تناسلی یا بیماری‌های زمینه‌ای، شیوع آن متفاوت می‌باشد (۱۶).

۱-۱۳-۴-۳ عفونت مثانه

در این بیماران علائم شامل سوزش، تکرر واضطرار^{۱۲} ادرار می‌باشد. اغلب، در ناحیه مثانه درد وجود دارد. در برخی موارد، ادرار به شدت خون‌آلود است. به دلیل آنکه عفونت مثانه یک عفونت موضعی است، در آن تب و دیگر علائم سیستمیک وجود ندارد (۱۶).

۱-۱۳-۴-۴ سندرم حاد مجرا

بیماران مبتلا به این سندرم در درجه اول زنان جوان و دارای فعالیت جنسی هستند که از سوزش، تکرر ادرار رنج می‌برند، اما تعداد باکتری در کشت ادرار آنها کمتر از 10^5 واحد تشکیل‌دهنده کلنی^{۱۳} در هر میلی‌لیتر (CFU/ml) است. در این گروه از بیماران، باید به جای معیار 10^5 CFU/ml از 10^2 CFU/ml به عنوان cutoff استفاده شود، اما باید در این شرایط بر وجود همزمان گلبول سفید در ادرار (وجود ۸ عدد یا بیشتر گلبول سفید در هر میلی‌متر میکروسکوپی ادرار سانتیفریوژ نشده) تاکید گردد. تقریباً ۹۰٪ از این زنان به پیوری (وجود گلبول سفید در ادرار)، مبتلا هستند (۱۶).

۱-۱۳-۴-۵ پیلونیفریت

پیلونفریت به التهاب بافت اصلی کلیه، کالیکس‌ها (بخش فنجانی شکل در لگنچه کلیه)، لگنچه (انتهای فوقانی میزنای که در داخل کلیه واقع شده است) گفته می‌شود که معمولاً بر اثر عفونت باکتریایی ایجاد می‌گردد. از علایم پیلونفریت، وجود تب و درد پهلو، همچنین علایم مربوط به دستگاه تحتانی (تکرر ادرار، اضطراب و سوزش ادرار) می‌باشد. بیماران همچنین ممکن است علایم سیستمیک عفونت نظیر استفراغ، اسهال، لرز، افزایش ضربان قلب و درد در ناحیه تحتانی شکم را بروز دهند (۱۶).

۱-۱۳-۵ سپتی سمی

هنگامی که دفاع طبیعی بدن میزبان ضعیف است *E.coli* به خون وارد شده و باعث سپتی سمی می‌شود. میزان مرگ و میر در سپتی سمی به منبع عفونت و بیماری زمینه‌ای بستگی دارد. بیشترین میزان مرگ و میر در بیماران با اختلالات ایمنی بوده به خصوص افرادی که عفونت‌های داخل شکمی دارند. *E.coli* ممکن است باعث آرتریت چرکی، اندوکاردیت، استئومیلیت، سینوزیت، آبسه‌های مغزی، پنومونی و سایر عفونت‌ها شود (۳۷).

۱-۱۳-۶ سپسیس

سپسیس ناشی از *E.coli* معمولاً به دنبال عفونت‌های UTI رخ می‌دهند و در زنان بیش از مردان دیده می‌شوند. در بیش از ۸۵ تا ۹۵ درصد بیماران مبتلا به سپسیس، بیماری‌های کبدی، بدخیمی‌های خونی، تومور و دیگر سرطان‌ها نیز رایج است. سپسیس و منتشریت اغلب ناشی از سویه‌های *E.coli* دارای آنتی ژن کپسولی K₁ می‌باشند (۳۸).

۱-۱۳-۲ عفونت‌های روده‌ای (گاستروانتریت)

عفونت‌های گوارشی ناشی از باکتری *E.coli* بسته به سویه خاص این باکتری به صورت اسهال ساده تا اسهال همراه با خون است و با تأمین آب و الکترولیت‌های مورد نیاز بدن درمان می‌شود و نیازی به مصرف

آنتی بیوتیک نیست. تاکنون چندین پاتوتیپ *E.coli* اسهال را در انسان شناخته شده است که به ۶ گروه تقسیم می شوند: *DAEC* ، *ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, EIEC*، ۹۰٪ بیماری اسهال ایجاد شده توسط سویه های *E.coli* به صورت اسهال آبکی و ۱۰٪ آن به صورت اسهال خونی می باشد (۲۲).

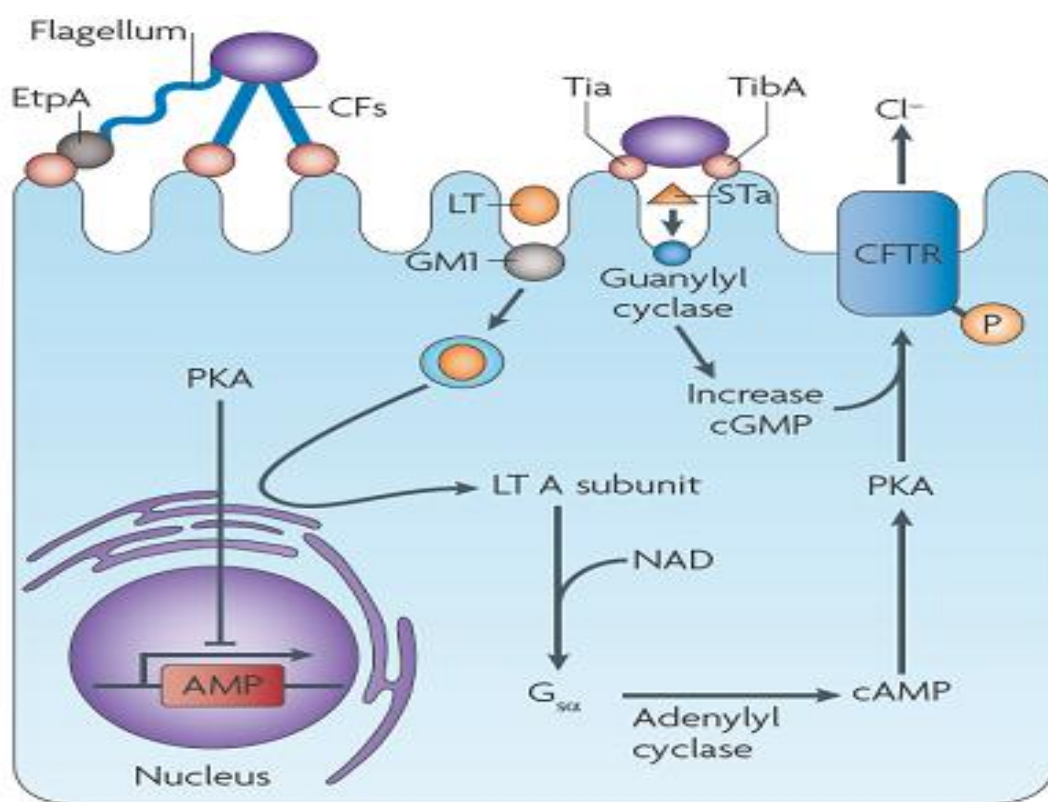
۱-۱۳-۲-۱ نژادهای *ETEC*

سویه های *ETEC* یکی از اصلی ترین عوامل اسهال در مسافران و همچنین از عمده ترین عوامل اسهال در گوساله، بره ها و خوک ها می باشد. آب و مواد غذایی آلوده از مهمترین عوامل انتقال بیماری می باشد. اتصال اولیه سویه های *ETEC* به سلول های اپی تلیال روده کوچک به واسطه فاکتور های کلونیزاسیون (CFs) و فلاژل صورت می گیرد. و همچنین اتصال توسط پروتئین های غشاء خارجی Tib A و Tia صورت می گیرد. Tib A با پروتئوگلیکان های سطح سلول میزان واکنش می دهد و Tia کد کننده یک پروتئین اتوترانسپورتر (AT) می باشد. گاستروانتریت های ایجاد شده در این سویه ها توسط دو نوع توکسین حساس به حرارت (LT) و توکسین مقاوم به حرارت (ST) ایجاد می شود. این توکسین متشکل از یک ساب یونیت A و پنج ساب یونیت B بوده و شبیه توکسین ویبریوکلرا می باشد. ساب یونیت B باعث اتصال باکتری به همان گیرنده ویبریوکلرا (گانگلوzyd GM1) و ورود ساب یونیت A به داخل سلول هدف می شود. این ساب یونیت سبب فعالیت آدنیلات سیکلاز و افزایش آدنوزین مونو فسفات حلقوی (AMP) می شود در نتیجه سدیم، کلر، بی کربنات و آب از سلول ها خارج شده و در محوطه روده جمع شده که سبب اسهال آبکی می گردند (۳۹،۴۰).

توکسین مقاوم به حرارت (ST) سبب فعالیت گوانیلات سیکلاز و افزایش گوانیل مونو فسفات حلقوی^{۱۰۴} (GMP) شده و در نتیجه باعث ترشح آب و مایعات به داخل روده می شود. سویه های *ETEC* منجر به اسهال حاد شده و شروع علائم اسهال با یک زمان انکوباسیون کوتاه (۴۰-۱۵ ساعت) همراه می باشد و

^{۱۰۴} Cyclic Guanosine Monophosphate

اسهال آبکی بدون خون و مخاط و لوکوسیت (PMN) بوده و در اکثر موارد بدون تب و استفراغ می باشد. هیچ تغییر پاتولوژیک در روده صورت نمی گیرد. اسهال ایجاد شده توسط این سویه ها خود محدودکننده می باشد و پس از ۲-۳ روز بهبودی حاصل می گردد. و موارد مرگ و میر صرفاً در کودکان شیرخوار در کشورهای در حال توسعه مشاهده می شود. شناسایی این سویه ها با جستجوی توکسین های حساس به حرارت (LT) و توکسین های مقاوم به حرارت (ST) توسط پروب های ژنی و روش های بیولوژی صورت می گیرد. سروگروپهای شایع در سویه های *ETEC* شامل: O156 ، O63 ، O78 ، O85 ، O151 ، O148 ، O167 و.... (۳۹، ۴۰).



شکل ۵: مکانیسم پاتوژنز سویه های *ETEC* (۳۹).

۱-۱۳-۲ نژادهای *EHEC*

EHEC از جمله زیرگروههای *E.coli* تولید کننده شیکا توکسین می باشند. این سویه ها با اتصال به مخاط کولون و تولید وروتوکسین و نیز تولید ضایعات Attachment/Effacement (A/E)^{۱۰۵} همراه با تخریب میکروویلی ها منجر به سوءجذب می گردد. بیش از ۳۸۰ سروتایپ های مختلف VTEC از انسان و حیوان جدا شده اند که تعداد کمی از آن ها در انسان ایجاد بیماری می کند . سروتایپ های شایع در سویه های *EHEC* که وابسته به بیماری می باشد شامل: O111H8 ، O103H2 ، O26H11 ، O145H28 ، O157H7 ، O118H12 و... (۴۳-۴۱). مهمترین سروتایپ شایع آن O157H7 می باشد . سویه های O157H7 غیر متحرک بوده و این سویه ها را از طریق عدم تخمیر سوریتول در محیط مک کانکی شناسایی می کنند. این سروتایپ در دهه های گذشته به عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان در کشورهای آمریکای شمالی، اروپا و کانادا معضلات بهداشتی فراوانی به بار آورده به طوریکه بروز سالیانه آن در کشورهای اسکاتلند و کانادا و آمریکا ۸-۹ در هر صد هزار جمعیت می باشد و در بعضی از نقاط آمریکای جنوبی به خصوص آرژانتین سندروم اورمی همولیتیک آندمیک بوده و ۵-۱۰ برابر آمریکای شمالی است. O157H7 در سال ۱۹۸۲ یعنی زمانی که دو اپیدمی کولیت هموراژیک با علائم کرامپ های شکمی ، اسهال آبکی بدون تب و یا تب خفیف همراه بود ، به عنوان پاتوژن انسانی شناخته شد. در سال ۱۹۸۳ کارمالی و همکارانش ارتباط عفونت با نوعی *E.coli* که توکسین شیکا توکسین تولید می کند (O157H7) و سندروم اورمی همولیتیک بعد از اسهال را که با آسیب حاد کلیوی ، ترومبو سیتوپنی ، آنمی همولیتیک و میکروآنژیوپاتیک همراه است نشان داد(۴۳-۴۱).

دام ها از مهمترین منابع عامل بیماری می باشند. آب ، مواد غذایی و سبزیجات از مهمترین راههای انتقال بیماری می باشند. سویه های O157H7 با دوز عفونی بسیار کم (۱۰-۱۰۰ ارگانیسم) ایجاد بیماری می نماید. همه گیری های ایجاد شده توسط این ارگانیسم معمولاً با مصرف آب و غذای آلوده به مدفوع گاو و

همچنین شیر غیر پاستوریزه و آبمیوه و سبزیجات تازه همراه می باشد. آلودگی با سویه های O157H7 تقریباً در تمامی دنیا گزارش شده است. مهمترین فاکتور ویرولانسی سویه های O157H7 تولید یک یا چند شیگا توکسین (ST) است که به نام وروتوکسین می باشد. شیگا توکسین تیپ I (STX1) قابل شناسایی از شیگلا توکسین تیپ I I (STX2) نمی باشد. شیگا توکسین II مولکول متفاوتی بوده و فقط ۵۶٪ از اسیدهای آمینه آن با شیگلا توکسین تیپ I همولوگ دارد. اغلب سوش های O157H7 تولید کننده شیگا توکسین II هستند و درصد تولید شیگلا توکسین I از ۲۵٪ در سوش های اروپایی تا ۸۰٪ در آمریکای جنوبی و ژاپن متغیر می باشد (۴۳-۴۱).

سویه های *EHEC* شایع ترین عامل اسهال در کشورهای توسعه یافته می باشد بیماری می تواند از فرم خفیف تا کولیت خونریزی دهنده شدید که با دردهای شکمی و اسهال خونی و کمی تب همراه است، بروز کند. یکی دیگر از بیماری های این گروه سندروم اورمی همولیتیک (HUS) ^{۱۰۶} است. این بیماری در ماههای گرم سال و در نیمکره شمالی و جنوبی شایعتر است و در کودکان کمتر از ۵ سال شیوع بیشتری دارد. مکانیسم ایجاد کولیت هموراژیک و سندروم اورمی همولیتیک مشخص نیست. ارگانیسم به سلول های مخاط روده بزرگ می چسبد و brush border را خراب می کند. بدیهی است که این مکانیسم برای تولید اسهال آبکی کافی است ولی توکسین شیگا اثرات موضعی و سیستمیک در روده دارد و احتمالاً به همین دلیل ایجاد اسهال خونی می شود. تغییرات هیستوپاتولوژیک شامل خونریزی، ادم در لامینا پروپریا^{۱۰۷} با نکروز موضعی سطحی می باشد. سندروم اورمی همولیتیک (HUS) بعد از اسهال یک بیماری میکروواسکولار است که وقتی توکسین شیگا در روده تولید شد وارد خون شده و به سلول های آندوتلیال

Hemolytic uremic syndrome ^{۱۰۶}
lamina propria ^{۱۰۷}

کلیه که واجد گیرنده Gb3 می باشند متصل می شود و این باعث تجمع فیبرین و پلاکت و آسیب رساندن به عبور گلبول قرمز (همولیز) و انسداد میکروواسکولرهای کلیه (نارسایی کلیه) می باشد (۴۳-۴۱).

۱-۱۳-۲-۱ تظاهرات بالینی

تظاهرات بالینی عفونت با *E. coli* O157H7 از ناقلین بدون علامت تا اسهال خونی، کولیت هموراژیک^{۱۰۸} و سندروم اورمی همولیتیک و مرگ متغیر است دوره کمون ۸ روز و به طور متوسط ۳ روز می باشد. اغلب مبتلایان به کولیت هموراژیک در عرض ۷ روز سریعاً بهبود می یابند. بیماری با کرامپ های شکمی و اسهال غیر خونی شروع می شود و مدفوع در عرض ۱-۲ روز خونی می شود. بیش از ۷۰٪ بیماران دارای اسهال خونی و ۶۰-۳۰٪ موارد استفراغ و در ۳۰٪ موارد تب گزارش شده است. سندروم اورمی همولیتیک مهمترین عارضه *E. coli* O157H7 می باشد که نشانه های آن نارسایی حاد کلیوی، آنمی همولیتیک و کاهش پلاکت (ترومبوسیتوپنی) و اورمی که نیاز به دیالیز دارند، می باشد. این علایم می تواند همراه با علایم نورولوژیک، انفاکتوس، تشنج و کوما در ۲۵٪ موارد باشد (۴۲، ۴۱).

۱-۱۳-۲-۳ نژادهای EPEC

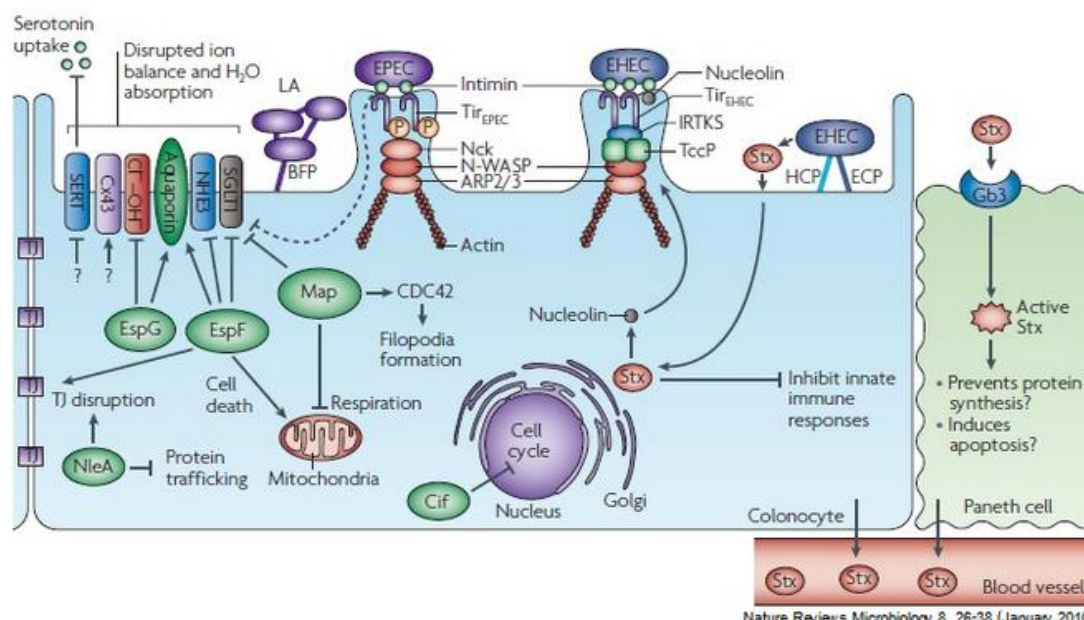
این سویه عامل اسهال اپیدمیک در کودکان کمتر از یکسال (اغلب ۶ ماهه یا حتی کمتر) به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد. بیشترین شیوع اسهال در سال ۱۹۴۵ در انگلستان توسط Bray شرح داده شد. این سویه به وسیله سروتایپینگ قابل شناسایی می باشند. *EPEC* ژن هایی را تحت عنوان LEE^{۱۰۹} (Locus of enterocyte effacement) کد می کنند و این ژن ها هم یک پروتئین غشاء خارجی به نام ایتمین که واسطه اتصال *EPEC* به سلول های اپی تلیال می باشد را کد می کنند. سویه های *EPEC* دارای یک پلاسمید ۷۰-۱۰۰ کیلو دالتونی به نام EAF^{۱۱۰} می باشد که پیلی تیپ IV را که تحت عنوان پیلی

^{۱۰۸} Hemorrhagic Colitis

^{۱۰۹} Locus of enterocyte effacement

^{۱۱۰} EPEC adherence factor

تشکیل دهنده کلاف (bfp) است و واسط اتصال به سلول های اپی تلیال می باشد را کد می کند، بنابراین این سویه ها توسط این پیلی (پیلی تیپ IV) به سلول های اپی تلیال روده کوچک متصل می گردد و باعث تخریب میکروویلی روده و اکتین سلول های میزبان می شوند. این باکتری ها ایجاد میکروکلونی هایی بر روی سطح سلول های اپی تلیال روده می کنند و پروتئین Translocated intimin receptor (Tir) با دخالت دو پروتئین دیگر به داخل غشاء سلول اپی تلیال نفوذ می کند و به عنوان رسپتور برای آدهزین های غشاء خارجی باکتری (ایتمین) عمل می کند. این فرایند در نهایت منجر به فرایند پاتولوژیک A/E می گردد، و این ضایعات توسط ژن های LEE ایجاد می شود. اسهال ایجاد شده توسط این سویه به صورت آبکی موکئید و بدون خون می باشد. و حجم اسهال کمتر از سویه های *ETEC* می باشد و هیچ سلول التهابی در اسهال مشاهده نمی شود در بچه ها ممکن است تب و اسهال بیشتر از دو هفته ادامه داشته باشد (۴۴،۴۵).



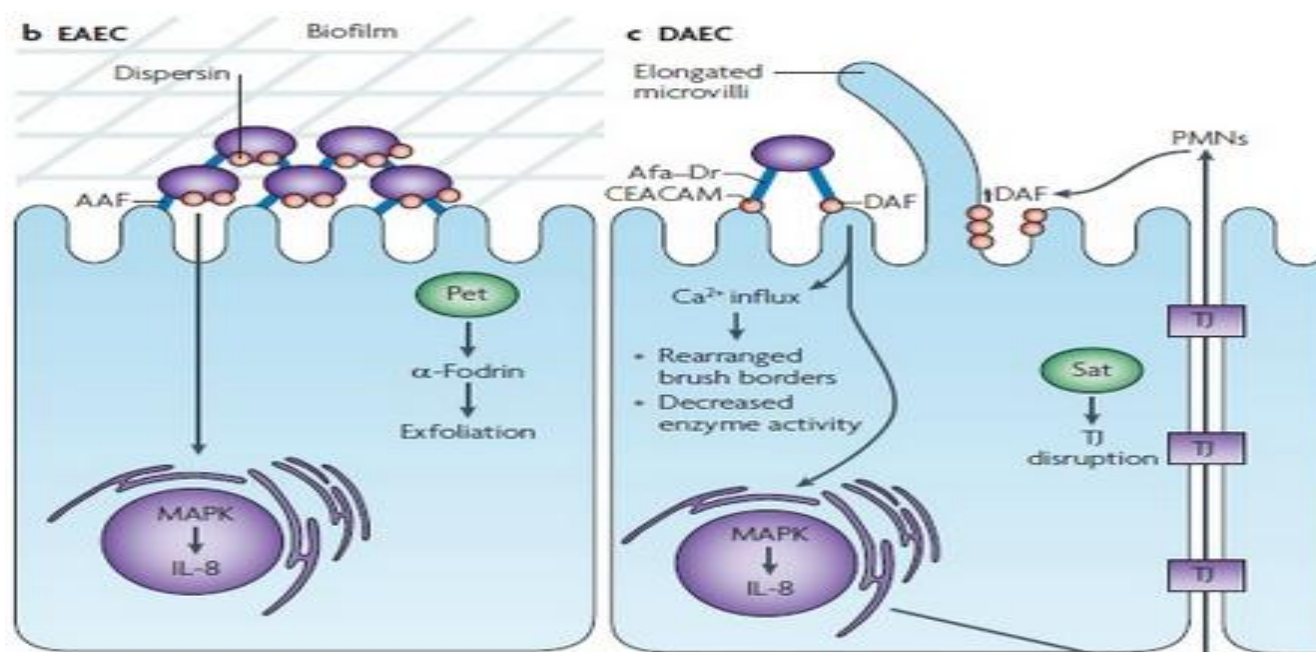
شکل ۶: مکانیسم یاتورنر *EPEC* و *EHEC* (۴۴).

Translocated intimin receptor '''

سویه *EAEC* یکی از عوامل اسهال های ناشی از مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته است، و همچنین دومین عامل اسهال مسافران بعد از *ETEC* می باشند. این سویه باعث ایجاد اسهال پایدار با دهیدراتاسیون حاد و مزمن می شود. *EAEC* باعث ایجاد همه گیری های زیادی در کودکان و بزرگسالان در سراسر دنیا شده است. این ارگانیسم احتمالاً یک عامل مهم ایجاد کننده اسهال دوران بچگی در کشورهای توسعه یافته می باشد. این یکی از معدود باکترهای مرتبط با اسهال مزمن^{۱۱۲} و تاخیر رشد^{۱۱۳} در بچه ها می باشد. باکتری ها به وسیله اتو آگلوتیناسیون خود در یک آرایش اجرهای انباشته شده^{۱۱۴} مشخص می گردند. این فرایند به واسطه فیمبریه I چسبندگی تجمع کننده (AAF)^{۱۱۵}، آدهسین هایی که شبیه BFP مسئول تشکیل میکروکلونی در *EPEC* می باشد، واسطه گری می گردد. همچنین دیگر فیمبریه های چسبنده تجمع کننده (AAF/II, AAF/III) شرح داده شده است. پس از اتصال *EAEC* به سطح روده ترشح موکوس را تحریک می کند و منجر به تشکیل بیوفیلم ضخیمی می شود که سبب محافظت باکتری از آنتی بیوتیک ها و سلول های فاگوسیت کننده می شود. علاوه بر این دو گروه توکسین مرتبط با *EAEC* می باشند: توکسین مقاوم به حرارت انترواگریگیتیو^{۱۱۶} (EAST) و توکسین کد شونده توسط پلاسمید (PET)^{۱۱۷} می باشد. EAST ترشح مایع را تحریک می کند و از نظر آنتی ژنی به توکسین مقاوم به حرارت *ETEC* وابسته می باشد. PET نیز سبب ترشح مایع می شود. *EAEC* به طور فزاینده ای به عنوان عامل اغلب اسهال های

^{۱۱۲} Chronic Diarrhea
^{۱۱۳} Growth Retardation
^{۱۱۴} Arrangement Stacked-Bribe
^{۱۱۵} Aggregative Adherence Fimbriae
^{۱۱۶} Enteroregative Heat Stable Toxin
^{۱۱۷} Plasmid Encoded Toxin

دائمی در کودکان و بزرگسالان در کشور های در حال توسعه و پیشرفته و به عنوان عامل چندین همه گیری ناگهانی در سراسر دنیا شناخته شده است. (۴۶،۴۷).



شکل ۷: مکانیسم پاتوژنز EAEC و DAEC (۴۶).

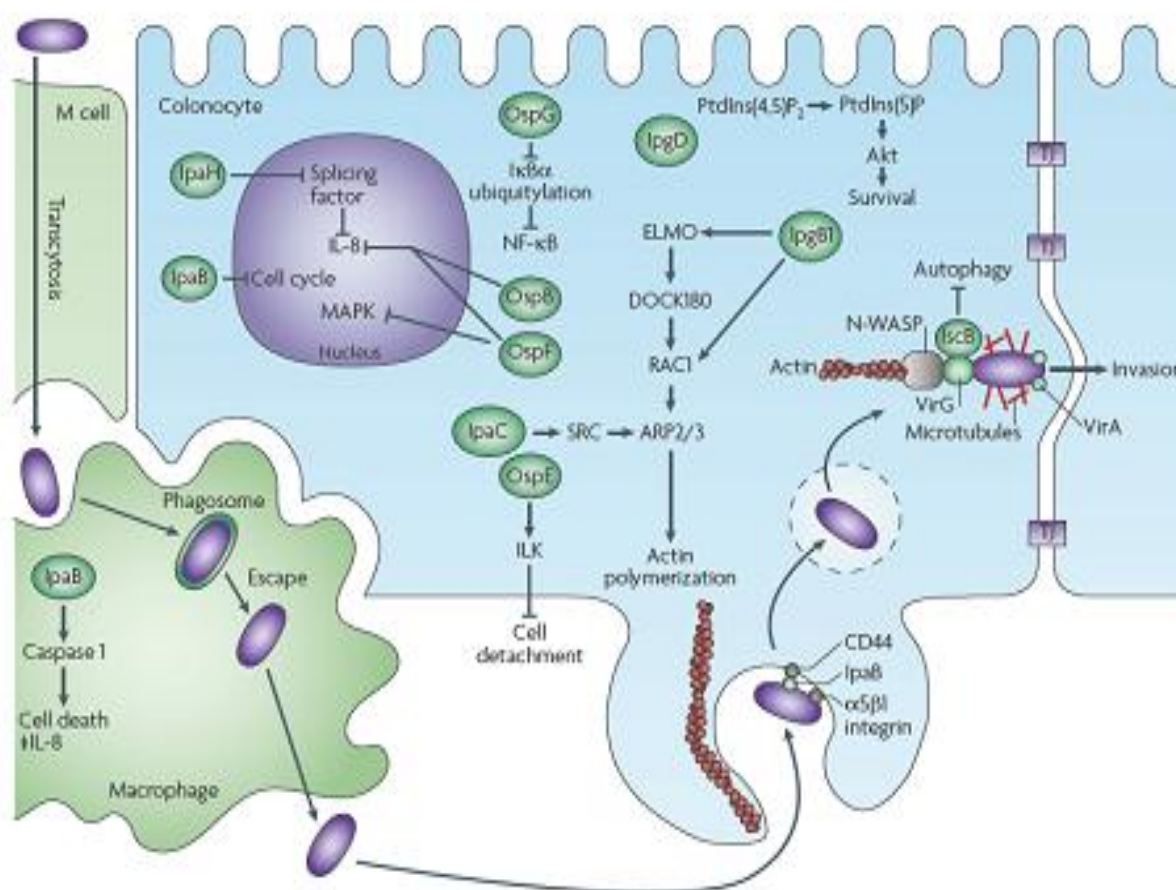
۵-۲-۱۳-۱ DAEC (*Diffusely adherante Escherchia coli*)

این سویه پاتوتایپ روده کوچک می باشد و شامل دو پروتئین پیلی (Dr ، F1845) و ادهزین های غیر فیمبریه ای (Afa) می باشد این سویه ها در روده کوچک مستقر شده و ایجاد اسهال در کودکان ۱۸ ماهه تا ۵ ساله می شوند. علاوه بر این ایجاد UTI در بزرگسالان می کنند (۳۰).

۶-۲-۱۳-۱ EIEC نژادهای

عفونت با سویه EIEC نادر است این سویه ها از نظر ژنتیکی و بیوشیمیایی مشابه شیگلا می باشد. باکتری ها توانایی حمله و تخریب سلول های اپی تلیوم کولون و ایجاد بیماری که به صورت اولیه به شکل اسهال ابکی بروز می نماید را دارند. تعداد اندکی از بیماران به سمت فرم دیسانتری که تشکیل شده از تب،

دردهای شکمی، خون و لوکوسیتوز در نمونه های مدفوعی پیش می روند، و حدود ۵-۷ روز ادامه دارد. ژن های ضروری در تهاجم به اپی تلیال ($^{118}\text{IpaA}$ تا IpaD) می باشد. باکتری واکوئل های فاگوسیتی را لیز نموده و در داخل سیتوپلاسم سلول تکثیر می یابد. جابجایی در داخل سیتوپلاسم سلول میزبان و همچنین سلول های اپی تلیال مجاور به وسیله تشکیل دم های اکتین^{۱۱۹} تنظیم می گیرد. این روند تخریب سلول های التهابی می تواند به سمت زخم کولون پیشرفت نماید. آسیب بافتی و التهاب در این بیماری به علت PMN ها است. *EIEC* می تواند کولیت التهابی مهاجم و اغلب دیسانتری ایجاد کند اما در اکثر موارد باعث ایجاد اسهال ابکی می شود که از سایر عفونت ها در اثر پاتوژن های *E.coli* غیر قابل تمایز است. (۴۸).



شکل ۸: مکانیسم پاتوژن *EIEC* (۴۸).

جدول ۲: پاتوتایپ های مختلف *E.coli* که عامل گاستروانتریت هستند (۱۸).

پاتوزنز	بیماری	مکان عمل	ارگانیسم
انترو توکسین های مقاوم به حرارت/یا حساس به حرارت وابسته به پلاسمید که افزایش ترشح مایعات و الکترولیت ها را تحریک می کنند	اسهال مسافران، اسهال نوزادان در کشورهای در حال توسعه، اسهال ابکی، استفراغ، کرامپ، تهوع تب با درجه پایین	روده کوچک	(ETEC)
هیستوپاتولوژی A/E وابسته به پلاسمید همراه با تخریب ساختار میکروویلی ها که منجر به سوءجذب و اسهال می شود	اسهال نوزادان در کشورهای عقب مانده، اسهال ابکی، استفراغ، مدفوع غیر خونی	روده کوچک	(EPEC)
چسبندگی تجمع یابنده وابسته به پلاسمید باسیل ها (اجزای انباشته روی هم) همراه با کوتاه شدن میکرو ویلی ها، انفیلتراسیون تک هسته ای ها، خونریزی و کاهش جذب مایعات	اسهال نوزادان در کشورهای عقب مانده، اسهال مسافران، اسهال ابکی پایدار همراه با استفراغ، دهیدراتاسیون و تب با درجه پایین	روده کوچک	(EAEC)
به وسیله توکسین های شیکا سائیتوتوکسیک (Stx-1, Stx-2) واسطه گری می شود که سنتز پروتئین را تخریب می نمایند. ضایعات (A/E: Attachment /Effacement) همراه با تخریب میکروویلی های روده، در نتیجه جذب کاهش یافته	اسهال ابکی اولیه که متعاقبا با اسهال شدید خونی، (کولیت هموراژیک) با کرامپ های شدید شکمی، تب مختصر یا بدون تب، ممکن است به سمت سندروم اورمی همولیتیک پیشرفت نماید	روده بزرگ	(EHEC)
تهاجم وابسته به پلاسمید و تخریب سلول های اپی تلایل کولون	بیماری در کشورهای در حال توسعه، تب، کرامپ، اسهال ابکی، ممکن است به سمت دیسانتری با مدفوع خونی اندک پیشرفت نماید	روده بزرگ	(EIEC)

۱-۱۳-۳ عفونت های دیگر

باکتری *E.coli* از عوامل شایع باکتری می باشد که می تواند به شوک سپتیک به همراه کاهش فشار خون و تب منجر شود و این ممکن است با اورمی و سندروم زجر تنفسی و کما و مرگ بغرنج تر شود. در مواردی از *E.coli* UTI با انسداد مجاری ادراری باکتری می و سپتی سمی ممکن است ایجاد شود. باکتری می به ۴ گروه فیلوژنتیک تقسیم می شود (A,B1,B2,C,D). اکثر ایزوله هایی که عامل عفونت های خارج روده ای می باشند در گروه B2 و تعداد کمی در گروه D قرار دارند. چندین مورد از آندوفتالمیت *E.coli* در بیماران دیابتی مبتلا به UTI و پیلونفریت گزارش شده است. این باکتری می تواند عامل عفونت های پس از جراحی و عفونت زخم شوند (۳۳،۴۹،۵۰).

۱-۱۴ اپیدمیولوژی

تعداد زیادی از *E.coli*، به صورت فلور نرمال در مجرای گوارشی زندگی می کنند، ولی زمانی که فرد سیستم ایمنی آن ضعیف می شود باکتری می تواند از روده آسیب دیده وارد فضای پریتون شود و به صورت باکتری فرصت طلب در بدن ایجاد بیماری کنند. اکثر *E.coli*، عامل عفونت های غیر روده ای می باشند و از فردی به فرد دیگر به ویژه در محیط های بیمارستانی، از طریق سوند و وسایل پزشکی، می تواند منتقل گردد. *E.coli* همچنین می تواند باعث عفونت های روده ای گردد، که از راه مدفوعی - دهانی از طریق دست آلوده یا از طریق غذا یا آب آلوده یا مصرف گوشت نیمه پخته یا شیر آلوده منتقل می گردد (۱۴،۱۵).

۱-۱۵ پیشگیری

این باکتری از طریق تماس با دست افراد و وسایل و ابزار تزریقات و مایعات تزریقی به بدن منتقل می گردند. بنابراین، شستشوی دست ها قبل و بعد از تماس با بیمار، دقت در استریل کردن وسایل بیمار و دستگاه ها و محدود کردن تزریقات داخل وریدی، پیشگیری از آلودگی مجرای ادراری تا حد زیادی در پیشگیری و کنترل عفونت نقش دارد (۱۴،۱۵).

۱-۱۶ درمان

درمان واحدی که به طور اختصاصی در مورد باسیل های گرم منفی روده ای مؤثر باشد وجود ندارد. آمپی سیلین، سولفونامیدها، تتراسایکلین و آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین ها و ... اثرات ضد باکتری در باسیل های روده ای دارند. اما به علت تفاوت بسیار در حساسیت انواع مختلف این باکتری ها، بهتر است قبل از اقدام به درمان، تست تعیین حساسیت در برابر آنتی بیوتیک ها را انجام داد. میزان مقاومت به آمپی سیلین، سفالوسپورین های نسل اول، کوتریموکسازول، آموکسی سیلین، کلاوولانات، پپراسین در حدی است که مانع از مصرف آنها می شود، ولی میزان مقاومت به سفالوسپورین های نسل دوم، سوم و چهارم، کینولون ها، مونوباکتام ها، کارباپنم ها و آمینوگلیکوزیدها به نسبت آنتی بیوتیک های دیگر پایین است (۱۵، ۱۶).

۱-۱۷ آنتی بیوتیک های کینولونی

۱-۱۷-۱ مقدمه

کینولون ها مواد ضد باکتریایی سنتتیک هستند که تاثیر بسزایی در زمینه شیمی درمانی ضد باکتریایی به ویژه در سال های اخیر داشته است. کینولون ها دارای ویژگیهای زیادی از جمله اثر بخشی بالا، فعالیت وسیع الطیف آن ها، دسترسی زیستی بالا و فرمولاسیون خوراکی و تزریقی داخل عروقی، سطوح سرمی بالا، حجم بالای توزیع که نشان دهنده غلظت مشخص در بافت و پایین بودن احتمال بروز عوارض جانبی آن ها می باشد، که باعث شده این آنتی بیوتیک ها از اهمیت بالایی برخوردار شوند (۵۱).

۱-۱۶-۲ ساختمان شیمیایی کینولون ها و فلئوروکینولون ها

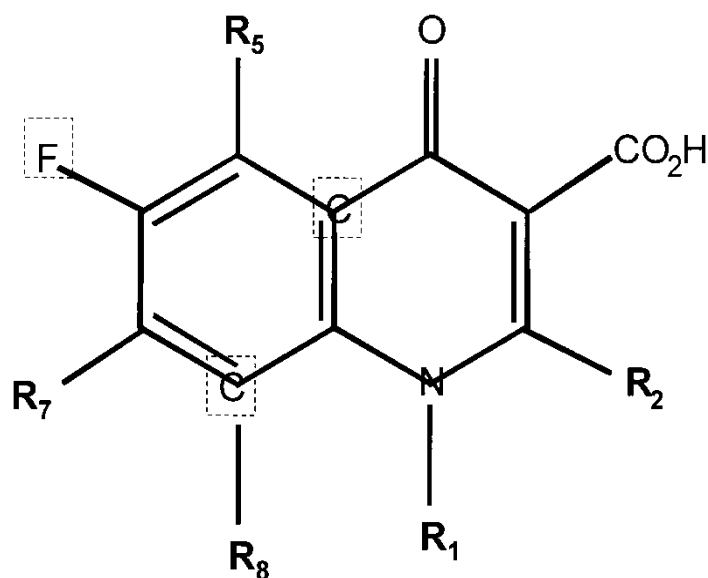
فلئوروکینولون ها همانند سولفونامید ها و نیتروفوران ها ترکیبات سنتتیک بوده و اکثر آن ها دارای حلقه ساختمانی مشترکی می باشند. تغییرات مختصر در این ساختمان و اضافه شدن گروههای گوناگون مسئول

ایجاد خواص فیزیولوژیکی مختلف که شامل اختلاف در چربی دوستی، میزان انتشار بافتی، جذب خوراکی و میزان دفع برای هر کدام از این داروها می باشد. ولی این تغییرات میزان طیف ضد باکتریایی را تغییر زیادی نمی دهند (۵۲).

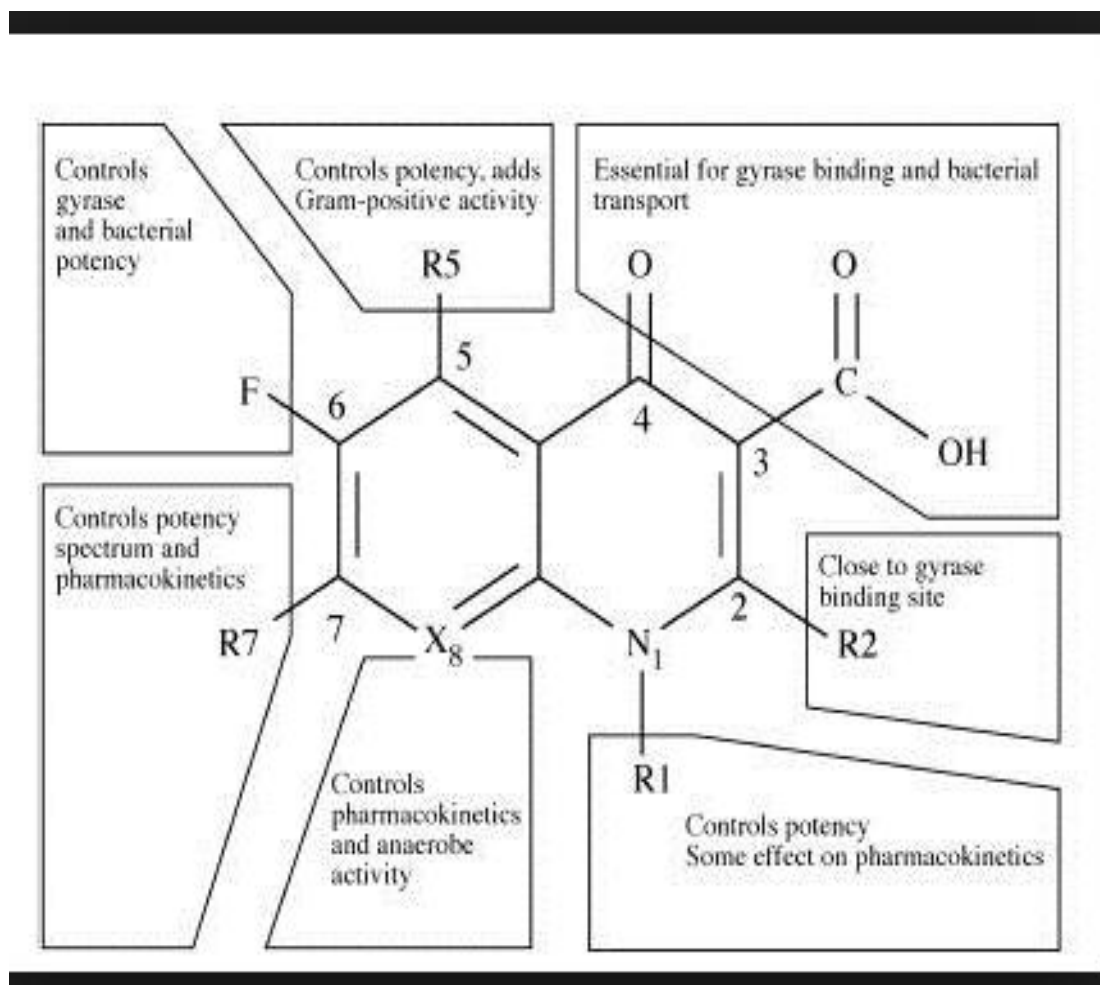
کینولون ها از کوئینین (quinine) مشتق شده اند. اضافه شدن یک مولکول فلورین در موقعیت ۶ یکی از ابتدایی ترین تغییرات در ساختار کینولون می باشد (۵۲). این اتم فلورین بیش از ۱۰ برابر خاصیت ممانعت کنندگی ژیراز و ۱۰۰ برابر MIC را بهبود می بخشد. هسته مرکزی کینولون یک ساختار اساسی برای تمام فلئوروکینولون ها و هم چنین فلئوروکینولون های تازه سنتز شده است به استثنای تروفلوکساسین و جمیفلوکساسین (Trovofloxacin and gemifloxacin) که هر دوی اینها حلقه مشابه نافتریدين (Naphthyridine) دارند. چهره عمومی فلئوروکینولون های جدید شامل حفظ نیتروژن در موقعیت ۱-N، کربوکسیلیک اسید در C-3، کتون در موقعیت C-4 و اتم فلورین در C-6 است. اینها مولکول هایی هستند که برای حفظ اثر ضد باکتریایی بسیار مهم می باشند. تغییرات و اصلاحاتی که در موقعیت های ۱، ۵، ۷ و ۸ صورت می گیرد منجر به شکل گیری فلئوروکینولون های جدید می گردند و تغییر در این موقعیت ها باعث ایجاد تغییر در پتانسیل ضد باکتریایی و نیز خصوصیات دیگر دارو است. افزودن یک گروه پیرازین در موقعیت C-7 (برای مثال نورفلوکساسین) بیشترین فعالیت را علیه باکتری گرم منفی هوازی فراهم می آورد و فعالیت علیه گونه های استافیلوکوکوس و پseudomonas را افزایش می دهد (۵۲، ۵۳). اطلاعاتی مبنی بر اینکه حلقه پیرازین مانع از پمپ افلاکس می شود وجود داشته که این خود توانایی این دارو را افزایش می دهد (۵۲). وجود گروه پایرولودینیل در موقعیت C-7 (برای مثال کیلینافلوکساسین) فعالیت بر علیه باکتری های گرم مثبت را افزایش می دهد (۵۲). آلکیلاسیون حلقه C-7، فعالیت علیه باکتری گرم مثبت هوازی را افزایش می دهد و همچنین نیمه عمر ترکیبات کینولون را افزایش می دهد. افزودن یک گروه متیل به نیتروژن دیستال حلقه پیرازین C-7 نیز نیمه عمر و دسترسی زیستی این ترکیبات را افزایش می دهد.

جایگزینی در موقعیت N-1 برای فعالیت فلئوروکینولون ها و تأثیرات ضد باکتریایی حائز اهمیت می باشد، به گونه ای که اتصال سیکلوپروپیل Cyclopropyl در موقعیت N-1 در تمام فلئوروکینولون های جدید به استثنای Trovafloxacin و Levofloxacin باعث ایجاد خاصیت ضد باکتریایی بیشتر و همچنین فعالیت ضد باکتریایی اپتیمال Optimal شده است. جایگزینی دیگر که در ایجاد خاصیت ضد باکتریایی بسیار مهم می باشد گروه 3-Carboxyl و Ketone در موقعیت C-4 می باشد که این نیز در اکثر فلئوروکینولون های جدید لحاظ شده است این جایگزینی باعث اتصال بهتر و موثرتر آنزیم به هدف خود می شود و در واقع اتصال DNA/DNA gyrase complex را تسهیل نموده و باعث نفوذ بهتر دارو بدخل سلول از خلال اثرات شلاته کننده ها Chelating effects می شود. موقعیت C-2 غالباً به شکل دست نخورده باقی می ماند. جایگزینی یک گروه متیل در موقعیت C-5 باعث افزایش تاثیرپذیری بیشتر بر گرم مثبت ها و نیز افزایش فعالیت دارو در Invitro می گردد، به عنوان مثال گریافلوکساسین نیز یک جانشینی بوسیله یک گروه CH₃ در C-5 دارد که توانایی ضد گرم مثبت آن در مقایسه با سیپروفلوکساسین بهبود پیدا کرده است. به شکلی که اگر گروه های بزرگتر در این جایگاه اضافه شوند، پتانسیل ضد میکروبی دارو به شکل قابل ملاحظه ای کاهش می یابد. اضافه کردن اتم فلورین نیز در موقعیت C-6 باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی می گردد به گونه ای که باعث مهار آنزیم DNAgyrase شده و نفوذ مولکول به داخل سلول را تسهیل می نماید و فعالیت بر علیه استافیلوکوکوس را فراهم می آورد. افزودن اتم فلورین دوم در ناحیه C-8 منجر به افزایش جذب و نیمه عمر طولانی تر می گردد. اهمیت این گروه در فلئوروکینولون های جدید به خاطر نامگذاری داروی جدید حاصله و کلاس بندی آنها بسته به گروه اضافه شده می باشد (۵۲، ۵۳). خواص حاصله در اثر جایگزینی گروه C-7 نیز مشابه C-6 می باشد. در حالی که جایگزینی گروه های مختلف در موقعیت C-8 باعث افزایش فعالیت دارو در Invivo و نیز تأثیر بر باکتریهای بی هوازی و هم چنین کاهش اثرات جانبی دارو می گردد، از این رو این گروه یکی از گروه های مهم هسته این داروها می باشد. هم چنین این

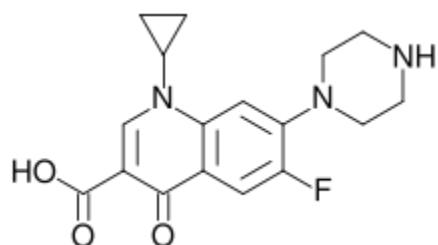
موقعیت می تواند بدون تغییر باقی مانده و یا گروه هایی مثل هالوژن و یا متوکسی اضافه گردد. هالوژناسیون در این موقعیت باعث افزایش طیف اثر بی هوازی ها و هم چنین افزایش جذب خوراکی و حلالیت در آب می شود (۵۳،۵۲). افزایش فعالیت علیه گونه های مایکوپلاسما و کلامیدیا از طریق افزودن یک گروه آمینو در C-5 و یک گروه فلورین در C-8 به ترکیبات کینولون که دارای یک گروه سیکلوپروپیل در N-1 هستند، قابل دستیابی است. به طور مشابهی ارتقا کلی فعالیت ضد باکتریایی به سادگی از طریق افزودن یک فلورین یا کلرین به C-8 این ترکیبات که دارای یک گروه سیکلوپروپیل در N-1 هستند امکان پذیر است. جدیدترین تغییر کلیدی مشاهده شده افزایش گروه متوکسی به جای هالید در موقعیت C-8 بود که به طور اختصاصی باعث هدف گیری هر دو توپوایزومراز II و IV می شود که در کاهش ایجاد مقاومت نسبت به کینولون ها موثر است. از بین عوامل ضد باکتریایی که در حال حاضر در دسترس هستند تنها گتی فلوکساسین و ماکسی فلوکساسین یک گروه C-8 متوکسی در ساختار شیمیایی خود دارند (۵۴).



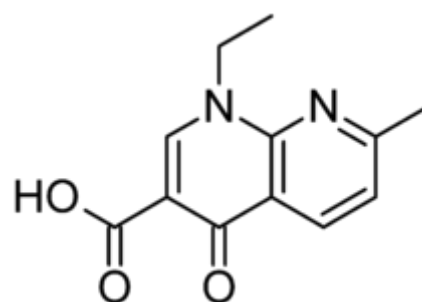
شکل ۹. ساختمان شیمیایی کینولون ها (۵۲).



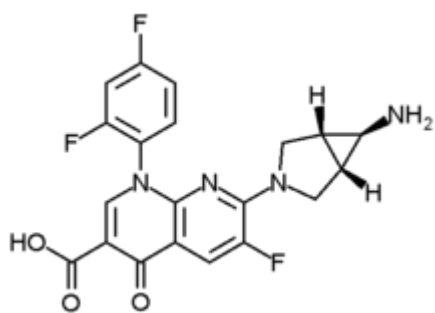
شکل ۱۰: ساختار پایه و شاخه های جانبی کینولون (۵۲).



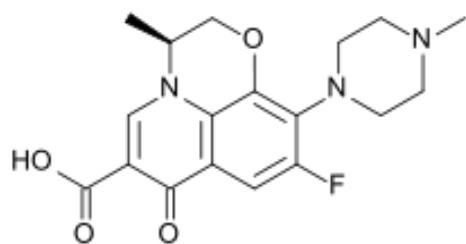
Ciprofloxacin



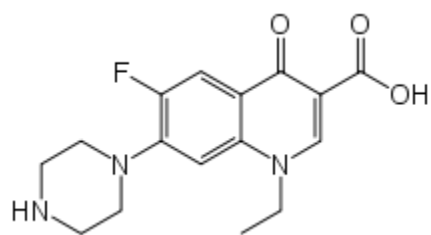
Nalidixic acid



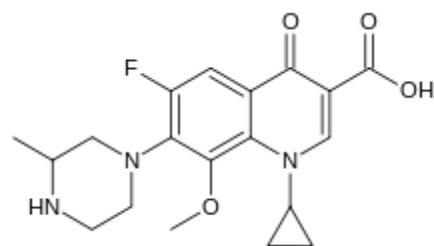
Trovafloxacin



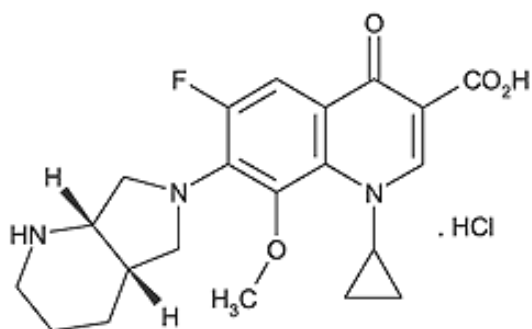
Levofloxacin



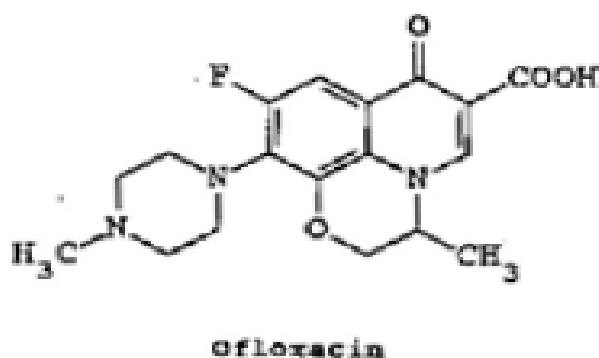
Norfloxacin



Gatifloxacin



Moxifloxacin



شکل ۱۱ : ساختار چند آنتی بیوتیک از خانواده کینولون ها (۵۲).

۳-۱۷-۱ تاریخچه

کینولون ها رده ای از عوامل ضد میکروبی هستند که از زمان کشف آن ها یعنی بیش از ۴۰ سال پیش علاقه ی چشمگیری نسبت به آن ها ایجاد شده است. کینولون ها بر خلاف برخی از آنتی بیوتیک ها از ارگانسیم های زنده گرفته نشدند بلکه به وسیله شیمیدان ها سنتز شده اند (۵۲).

کینولون ها از مشتقات کینولونیک کربوکسیلیک هستند، فعالیت باکتریوسیدال با طیف وسیع، جذب خوراکی بالا، اثرات جانبی نسبتاً کم و سهولت در مصرف همگی از عواملی هستند که باعث شد پس از عرضه به بازار مصرف در زمان بسیار کوتاهی به عنوان داروی خط اول درمان در بسیاری از موارد بالینی مورد مصرف قرار گیرند. نالیدیکسیک اسید به عنوان اولین داروی تجاری سنتتیک در خانواده کینولون ها هستند. در سال ۱۹۶۰ Barto و همکارانش ۶-کلرو-۱-هیدرواتیل، ۴-اکسو کوئینولون-۳-کربوکسیلیک اسید را طی تحقیقات علیه مالاریا جداسازی نمودند که فعالیت ضد باکتریایی داشت (۵۳). تولید پرولیفیک کینولون ها در سال ۱۹۶۲ آغاز شد، هنگامی که Lesher و همکارانش به طور تصادفی نالیدیکسیک اسید را به عنوان محصول

جانبی سنتز ترکیب ضد مالاریا (کلروکین) کشف نمودند. این اکتشاف منجر به شکل گیری مجموعه ای از ترکیبات کینولونی گردید (۵۲). از زمان کشف پیش ساز ۱ و ۸ نفتیریدین (نالیدیکسیک اسید)، به عنوان اولین داروی سنتتیک در سال ۱۹۶۲ تنها استفاده ای که از این دارو می شد در درمان عفونت های دستگاه ادراری ناشی از باکتری های گرم منفی بود، از آن پس دیگر اعضای کینولون ها ساخته شد و به عنوان داروی مهم و موثری در درمان عفونت های باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند، مانند پیمدیک اسید که در ژاپن ساخته شد و روی باکتری های گرم منفی به خصوص سودوموناس آئروژینوزا بسیار موثر بود، اگزولینیک اسید و سینوکساسین جزء اولین ترکیبات بودند، با تغییر ساختار این آنتی بیوتیک ها نسل های بعدی آنها نیز شناسایی شد که در بعضی موارد به سه و در برخی دیگر به چهار نسل تقسیم بندی می شوند. تفاوتی که نسل ها با همدیگر دارند در این است که از نظر موقعیت زنجیره های جانبی که به هسته کینولون متصل می شود متفاوت بوده که باعث ایجاد انواع ساختارها و اشکال مختلف کینولونی می شود. با اضافه شدن فلوردرموقعیت ۶ مولکول کینولون فعالیت آن افزایش پیدا کرد. وقتی اتم فلور روی کربن ۷ (موقعیت ۷) اضافه شود باعث افزایش نیمه عمر دارو در بدن و در نتیجه کاهش دوزهای مصرفی شده و ممکن است فرد با یک دوز نیز درمان شود و همچنین باعث افزایش نفوذ دارو به CNS نیز می شود و همچنین افزوده شدن اتم فلور به کربن شماره ۸ (موقعیت ۸) باعث افزایش فعالیت کینولون ها می شود (۵۶-۵۲). در سال ۱۹۷۴ مطالعه ای توسط Worcel به توصیف چگونگی بسته بندی کروموزوم در باکتری *E. coli* پرداخت، او مشاهده کرد کروموزوم به ۶۵ ناحیه تقسیم شده است که آن ها را دومین نامگذاری نمود، هر کدام از این دومین ها حدود ۲۰ میکرومتر طول داشت و به یک هسته ی RNA متصل بود. اندازه هر دومین با چرخش در جهت منفی کاهش یافته بود به این معنی که چرخش در جهت مخالف جهت طبیعی وضعیت مارپیچ DNA در حالت خطی بود. در سال ۱۹۷۶، Crumplin مشاهده کرد که نالیدیکسیک اسید منجر به تجمع غیر طبیعی پیش سازهای DNA تک رشته ای شده است. به طوریکه وقتی دومین کروموزومی سوپرکویل

می شود به صورت موقت شکسته می شود. علاوه بر این هنگامی که سوپرکویل کامل می شود، وضعیت تک رشته ای DNA از طریق فعالیت محکم نمودن آنزیمی که به طور اختصاصی توسط کینولون ها مهار می شود، از بین می رفت. این مشاهدات به توصیف چگونگی مکانیسم عمل کینولون ها بر علیه باکتری کمک قابل توجهی نمود. متعاقبا Gelert این آنزیم را که DNA دو رشته ای را برش می داد و سوپرکویل منفی ایجاد می کرد و پس از آن DNA برش یافته را به هم متصل می کرد، شناسایی نموده و آن را DNA ژیراز (توپوایزومراز II) نامگذاری کردند. به دنبال این مشاهدات چهار آنزیم DNA توپوایزومراز باکتریایی شناسایی شدند. توپوایزومراز I و III حساسیت زیادی به مهار توسط کینولون ها ندارند، در حالیکه توپوایزومراز II و IV دو هدف اصلی کینولون ها هستند. توپوایزومراز II و IV ساختارهای تترامری هستند که از دو جفت زیر واحد تشکیل شده اند. چهار زیر واحد توپوایزومراز II عبارتند از: ۲ مونومر A و ۲ مونومر B که به ترتیب با عناوین GyrA و GyrB مربوط به DNA ژیراز، شناخته می شوند. توپوایزومراز IV نیز زیر واحد های A و B دارد که به وسیله ژن های *ParC* و *ParE* کد می شوند. توپوایزومراز IV در جدا کردن مولکول های DNA متصل در سلولهای باکتریایی نقش دارد. بنابراین توپوایزومراز II و IV هدف های کشنده کینولون ها می باشند. شناسایی آن ها منجر به ایجاد کینولون های جدیدی شد که فعالیت ارتقاء یافته ای در مقابل توپوایزومراز II و IV دارند. در ۱۹۸۰ شمار زیادی از فلئورو کینولون های پیشرفته با اثرات بیشتر روی باکتری های گرم منفی (نه گرم مثبت) به دست آمد، در سال ۱۹۹۰ با تغییراتی که در ساختار این آنتی بیوتیک ها ایجاد شد نه تنها بر علیه گرم منفی ها بلکه بر علیه باکتری های گرم مثبت نیز موثر بودند. بعضی از اعضای جدید مثل ترووفلوکساسین بر علیه بی هوازی ها نیز موثر هستند (۵۷).

کینولون ها آنالوگ های سنتتیک نالیدیکسیک اسید هستند و آن ها را بر اساس فعالیت ضد میکروبی به ۴ نسل تقسیم کردند (۵۷-۵۹):

جدول ۳: نسل های کینولون ها (۵۷).

Generation	Drug Names	Spectrum
1st	Nalidixic acid, Cinoxacin Oxolinic acid	Gram- but not <i>Pseudomonas</i> species
2nd	Ciprofloxacin, Enoxacin, Fleroxacin, Lomefloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Pefloxacin, Rufloxacin	Gram- (including <i>Pseudomonas</i> species), some Gram+ (<i>S. aureus</i>) and some atypicals
3rd	Gemifloxacin, Levofloxacin Moxifloxacin, Sparfloxacin Pazufloxacin, Tosufloxacin Grepafloxacin, Gatifloxacin	Same as 2 nd generation with extended Gram+ and atypical coverage
4th	Trovafoxacin, Clinafloxacin Besifloxacin	Same as 3 rd generation with broad anaerobic coverage

۱-۱۷-۵ عملکرد

فلئوروکینولون ها از جمله وسیع الطیف ترین عوامل ضد میکروبی هستند که هم در محیط های بیمارستانی و هم در جامعه استفاده می شوند. کینولون ها همگی به وسیله ی مهار مستقیم سنتز DNA عمل می کنند. هدف این گروه از آنتی بیوتیک ها DNA ژیراز (توپوایزومراز II) و توپوایزومراز I، که هر دو آنزیم های ضروری برای تکثیر باکتری هستند، می باشد. هر کدام از این آنزیم ها متشکل از دو جفت زیر واحد می باشند زیر واحد های DNA ژیراز، GyrA یک پروتئین ۹۷ کیلودالتونی کد شده توسط ژن *gyrA* و GyrB یک پروتئین ۹۰ کیلو دالتونی کد شده توسط ژن *gyrB* می باشد، و در توپوایزومراز I زیر واحدهای

ParC (یا GrlA) یک پروتئین ۷۵ کیلودالتونی کد شده توسط ژن *parC* و ParE (یا GrlB) یک پروتئین

۷۰ کیلودالتونی کد شده توسط ژن *parE* می باشد. GyrA مشابه ParC و GyrB مشابه

ParE است (۵۷). DNA ژیراز می تواند سوپرکویل های منفی را به درون DNA وارد کند ، هر دو

سوپرکویل منفی و مثبت را بردارد ، مولکول های حلقوی بسته را باز کند و دوباره متصل کند. توپوایزومراز

۴ نیز می تواند سوپرکویل های منفی و مثبت را بردارد و در باز کردن رشته حتی بهتر از DNA ژیراز است

. هر دو آنزیم در نسخه برداری ، همانندسازی ، نوترکیبی و ترمیم DNA با هم فعالیت دارند. آنزیم ها به

طور موقت هر دو رشته DNA دو رشته ای را می شکنند و در یک واکنش وابسته به ATP یک DNA

دابل هلیکس ثانویه را از شکاف عبور می دهند که دوباره متصل می شود. کینولون ها این واکنش را بلوکه

می کنند و DNA ژیراز و توپوایزومراز IV را در یک کمپلکس DNA – آنزیم – دارو به دام می اندازد

. تعداد کمی از باکتری ها فقط با DNA ژیراز قادر به فعالیت هستند ، اما بیشتر باکتری ها هر دو آنزیم را

دارند . در باکتری های گرم منفی DNA ژیراز نسبت به توپوایزومراز IV به مهار توسط کینولون ها حساس

تر است ، در صورتی که در باکتری های گرم مثبت توپوایزومراز ۴ معمولا هدف اولیه است و ژیراز حساسیت

کمتری دارد (۶۰-۵۸).

کینولون با مجموعه ی DNA ژیراز-DNA و توپوایزومراز ۴-DNA واکنش داده و آنزیم را بدام انداخته

و سدی را برای تکثیر DNA ایجاد می کند. این عملکرد برای مرگ باکتری لازم است ولی کافی

نیست (۶۱،۶۲).

نسل اول کینولون ها که امروزه کمتر مصرف می شوند چون حالت توکسیسیته بیشتری روی افراد دارند و

فعالیت متوسطی روی باکتری های گرم منفی دارند ولی فعالیت چندانی بر علیه باکتری های گرم مثبت هوازی

و باکتری های بی هوازی ندارند و شامل نالیدیکسیک اسید، آگزولونیک اسید ، سینوکساسین ، پایرومیدیک اسید

، پایپمیدیک اسید ، فلومکوئین می باشند. در سال ۱۹۸۰ کینولون های نسل دوم معرفی شدند که فعالیت

بیشتری روی گرم منفی ها نسبت به گروه اول دارند اما برعلیه باکتری های گرم مثبت فعالیتشان محدود است، این عوامل بیشتر بر علیه باسیل های گرم منفی بی هوازی موثرند (۶۴، ۶۳، ۵۹). کینولون های نسل دوم شامل سیپروفلوکساسین ، نورفلوکساسین ، اوفلوکساسین ، لووفلوکساسین ، انوفلوکساسین ، فلروفلوکساسین ، پفلوکساسین ، روفلوکساسین می باشند (۵۲، ۵۹). کینولون های نسل دوم مثل لومی فلوکساسین، نور فلوکساسین و انوکساسین، همان کینولون های نسل اول هستند ولی در موقعیت ۶ دارای یک فلور بوده و این دارو ها عمدتاً "خوراکی بوده و برعلیه انتروباکتریاسه و به میزان محدودی باکتری های گرم مثبت اثر دارد. حساسیت و نیاز به کینولون های نسل دوم به طور محدود در درمان عفونت های استافیلوکوک ها، استرپتوکوک ها و عفونت های انتروککی است (۶۵). با ظهور سیپروفلوکساسین ، تقریباً برای اولین بار عفونت های گرم منفی جدی مستعد باکتریایی نظیر پیلونفریت ، پروستاتیت و استئومیلیت با کارایی بالا در بیماران سرپایی با تجویز آنتی بیوتیک های خوراکی درمان شد ، به طور مشابهی عفونت های تنفسی پسودوموناس آئروژینوزا در کودکان مبتلا به سستیک فیروز به طور خوراکی قابل درمان شد. فلئوروکینولون های جدیدتر از جمله فلئوروکینولون های نسل سوم شامل گریافلوکساسین، گتی فلوکساسین، پارفلوکساسین، تمافلوکساسین، توسوفلوکساسین و پازوفلوکساسین پس از آن تولید شدند و اثر بیشتری علیه باکتری های گرم مثبت به ویژه پنوموکوک ها دارند (۶۵). فلئوروکینولون های نسل سوم، فعالیت بر علیه باکتری های گرم منفی و داخل سلولی غیر معمول دارند اما باکتری های گرم مثبت را نیز پوشش می دهند و مزیت این نسل جذب گوارشی خوب آن می باشد، سطح سرمی آن ها خیلی بالا بوده و برای درمان عفونت های سیستمیک کارا می باشند هم به صورت تزریقی و هم خوراکی برعلیه انتروباکتریاسه، پاتوژن های غیرمعمول و استرپتوکوک ها مصرف می شوند. فلئوروکینولون های نسل چهارم نیز هم برعلیه باکتری های گرم منفی و هم گرم مثبت و عوامل بی هوازی موثرند و شامل تروافلوکساسین ، کیلینافلوکساسین ، سیتافلوکساسین ، موکسی فلوکساسین و ژمی فلوکساسین می باشند (۶۵).

نسل چهارم، این نسل از جمله تروافلوکسازین برعلیه طیف وسیعی از عوامل میکروبی مانند انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا، پاتوژن های غیرمعمول، استافیلوکوک اورئوس حساس به متی سیلین، استرپتوکوک ها و بی هوازی ها فعالیت دارد. هر چند گتی فلوکسازین و موکسی فلوکسازین برعلیه بی هوازی ها فعالیت دارند اما تنها تروافلوکسازین در درمان عفونت های بی هوازی استفاده می شود. پاتوژن های تنفسی داخل سلولی مانند کلامیدیا پنومونیه، مایکوپلاسما پنومونیه و لژیونلا پنوموفیلا به فلوروکینولون ها حساس هستند، این آنتی بیوتیک ها به عنوان داروهای خط دوم علیه بروسلا و همچنین برای درمان توبرکلوزیس مقاوم نیز به کار می روند (۶۵).

۱-۱۷-۶ کاربرد کینولون ها

کینولون ها را برای درمان بیماری های عفونی به صورت تزریقی یا خوراکی استفاده می کنند، از جمله این بیماری ها عفونت مجاری تنفسی شامل عفونت مجاری ادراری، عفونت گوارشی ناشی از توکسین *E. coli* یا سالمونلا، عفونت شیگلا، کمپیلوباکتر، آئروموناس، گونه های ویبریو و پلیزوموناس شیگلوییدس، برونشیت مزمن ناشی از عفونت های باکتریال حاد، پنومونی اکتسابی از جامعه، سینوزیت باکتریایی، عفونت پروستات باکتریال، عفونت پوست، عفونت استخوان، موثر واقع شده است. کینولون ها همچنین در درمان بیماری های مقاربتی نظیر عفونت های گونوککی و کلامیدیا مفید هستند (۵۲، ۵۳، ۵۹). سیپروفلوکسازین برای عفونت های دارای عوارض و بدون عوارض ادراری شامل سیستیت، پیلونفریت و پروستاتیت باکتریایی مزمن، عفونت های ادراری تناسلی بدون عوارض، گنوره مقعدی، پوست و سایر عفونت های بافت نرم، عفونت مفاصل و اسهال عفونی، تب تیفوئید، عفونت های داخل شکمی همراه با استفاده از مترونیدازول، سینوزیت، پنومونی بیمارستانی تایید شده است. لووفلوکسازین برای درمان عفونتهای مجاری ادراری بدون علامت شامل پیلونفریت و عفونت پروستات باکتریال مزمن، عفونت پوست، پنومونی اکتسابی از جامعه شامل انواع ناشی از استرپتوکوک پنومونیه مقاوم به پنی سیلین (PRSP) و استرپتوکوک پنومونیه مقاوم چند دارویی (MDRSP)

و پنومونی بیمارستانی تایید شده است. گتی فلوکساسین برای درمان عفونتهای مجاری ادراری دارای عوارض و بدون عوارض شامل پیلونفریت، گنوره ادراری تناسلی بدون عواض، عفونت های پوست سینوزیت حاد و پنومونی اکتسابی از جامعه شامل PRSP و MDRSP مورد تایید است. ماکسی فلوکساسین برای درمان سینوزیت باکتریال حاد، عفونت های پوستی، موارد حاد برونشیت مزمن باکتریایی و پنومونی اکتسابی از جامعه شامل PRSP و MDRSP تایید شده است. ژمی فلوکساسین برای درمان موارد حاد باکتریال برونشیت مزمن و پنومونی اکتسابی از جامعه با شدت کم تا متوسط تایید شده است (۶۶).

۱-۱۷-۷ عوارض جانبی

بروز عوارض در اثر استفاده از کینولون های نسل اول محدود است و این عوارض در چند روز اول درمان ظاهر شده و به وفور در افراد جوان و سالمندان مشاهده می شود. میزان عوارض در کینولون های خوراکی و تزریقی به دوز آن ها بستگی دارد، هر چقدر دوز دارو و مدت مصرف دارو زیاد باشد میزان عوارض بیشتر است. اختلالات گوارشی به میزان بیشتری گزارش شده است و پس از آن عوارض CNS، واکنش ازدیاد حساسیت، ندرتا کاهش فشار خون، افزایش ضربان قلب، پیدایش بلور در ادرار، کاهش ترومبوسیت در خون، لکوپنی و آنمی قرار دارد (۵۳). سه عارضه مشاهده شده در اثر کینولون ها شامل سمیت قلبی، کاردیوتوکسیسیته، سمیت کبدی و کاهش قند اینها بیشتر از سایر عوارض مورد توجه هستند (۵۳، ۵۹). برخی کینولون های اولیه با تئوفیلین و کافئین و سایر ترکیبات کینولونی (آن هایی که دارای فلورین در C-8 هستند) واکنش دادند و سمیت نوری متوسط تا شدید به دنبال داشتند زیرا با غلظت های بالا در پوست تجمع می یابند. سمیت نوری در مصرف لومفلوکساسین، فلوروفلوکساسین، پارفلوکساسین شایع تر و شدیدتر است (۵۳، ۵۹). مشاهده شده که فلئوروکینولون ها می توانند باعث آتروپاتی در حیوانات جوان مورد آزمایش شوند بنابراین این داروها به بچه ها در سنین پایین و خانم ها در سنین باروری توصیه نمی شود (۵۳، ۵۹).

۱-۱۷-۸ کسب و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها

امروزه مقاومت به آنتی بیوتیک ها در حال افزایش می باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی خیلی زود بعد از کشف اولین آنتی بیوتیک مشاهده شد آکساندر فلمینگ در سال ۱۹۲۴ مشاهده نمود برخی باکتریها مثل *E.coli* در برابر پنی سیلین از خود مقاومت نشان می دهند و در سال ۱۹۴۰ ادوارد ابرهام و ارنست چین نوعی آنزیم تخریب کننده پنی سیلین را در *E.coli* کشف کردند (۶۴). بسیاری از میکروب های مقاوم که در حال حاضر درمان آن ها دشوار است از نظر منشا ژنتیکی قابلیت انتقال بین گونه ای و جنس های باکتریایی را دارند (۶۴). توانایی باکتری ها برای تطابق با محیط اطراف یکی از عوامل بروز مقاومت های آنتی بیوتیکی می باشد. باکتری ها از طریق انتقال ژنتیکی ذخیره ژنومی خود را ارتقاء می دهند که این فرایند به واسطه عناصر ژنتیکی همچون پلاسمیدها و ترانسپوزون ها صورت می گیرد و از این طریق امکان انتقال فاکتورهای مقاومت در جمعیت کثیری از باکتری ها میسر می گردد مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها ذاتی یا اکتسابی می باشد، مقاومت ذاتی غالباً در مراحل اولیه استفاده از آنتی بیوتیک نمایان می شود و بی تأثیر بودن درمان با آن آنتی بیوتیک را نمایان می سازد، در مقاومت ذاتی، شکل عادی سلول در مهار عمل آنتی بیوتیک دخالت دارد اما در مقاومت اکتسابی غالباً از میان یک جمعیت سلولی تعداد معدودی قادر به بروز مقاومت بوده و نجات می یابند که این تعداد معدود سپس با انتقال مقاومت باعث مقاومت آن گونه باکتری به آنتی بیوتیک می شود، اغلب ژن های دخیل در بروز مقاومت ذاتی بر روی کروموزوم باکتری قرار دارد در صورتی که مقاومت اکتسابی غالباً در پی بروز جهشی در ژن های کروموزومی و سپس انتقال آن به پلاسمیدها^{۱۲۰} و ترانسپوزون ها^{۱۲۱} می باشد که در پی انتقال این مقاومت باعث معضلاتی در معالجه بیماران می شود (۶۴، ۶۷، ۶۸).

این نوع از مقاومت غالباً بواسطه بروز جهش در طول ژنوم باکتری روی می‌دهد. این تغییرات می‌تواند به صورت جزئی و یا وسیع صورت بگیرد. تغییرات کوچک که ضایعات کوچک^{۱۲۲} نیز نامیده می‌شود، غالباً در یک جفت باز روی می‌دهد که شامل جهش‌های جابجایی^{۱۲۳}، معکوس شدن^{۱۲۴} و یا تغییر قالب^{۱۲۵} می‌باشد. در این نوع از جهش‌ها تغییر در یک جفت باز باعث تغییر بیان ژن و بروز مقاومت می‌شود، در جهش‌های جابجایی جایگزین شدن یک باز پورین با باز پورین دیگری را داریم و در نتیجه آن، باز پیریمیدین با باز پیریمیدین دیگر جایگزین می‌شود. در جهش‌های جایگزینی، جایگزینی یک باز پورین با یک باز پیریمیدین را داریم و یا بالعکس و در جهش‌های تغییر قالب با افزوده یا حذف شدن بازها ترتیب خوانده شدن بازها تغییر اساسی می‌یابد (۶۷، ۶۸).

پلاسمیدها عوامل ژنتیکی هستند که خارج از کروموزوم باکتری بوده و به‌طور مستقل از کروموزوم قادر به تکثیر می‌باشند. این عوامل ژنتیکی غالباً حامل ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. از خصوصیات ویژه پلاسمیدها انتقال ساده این عوامل بین سلول‌ها می‌باشد. غالب ژن‌های دخیل در بروز مقاومت بر روی پلاسمیدها قرار دارند شاید یکی از دلایل حضور این ژن‌ها فشار انتخابی باکتری برای حفظ ژن‌های مورد نیاز و ضروری می‌باشد و در شرایط عدم وجود آنتی‌بیوتیک نیازی به حفظ این ژن‌ها نمی‌بینند و فقط تعداد معدودی از باکتری‌ها این ژن‌ها را حفظ می‌نمایند که در صورت قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها نسل حامل پلاسمید زنده می‌مانند و به تکثیر ادامه می‌دهند. علاوه بر این چون پلاسمیدها فاکتورهای ژنتیکی

Microlesions	۱۲۲
Transition	۱۲۳
Transversion	۱۲۴
Frame shift	۱۲۵

متحرک هستند می توانند به صورت درون گونه ای و یا حتی بین گونه ها انتقال یابند همچنین قادرند علاوه بر گونه های هم نوع از سایر گونه ها نیز کسب شوند (۶۷، ۶۸).

۱-۱۷-۸-۳ مقاومت ترانسپوزونی

ترانسپوزون ها فاکتورهای ژنتیکی هستند که در طول کروموزوم باکتری ها، میان عناصر ژنتیکی باکتری و حتی میان کروموزوم دو سلول قادر به انتقال می باشند اما این عناصر ژنتیکی برخلاف پلاسمیدها قادر به همانند سازی مستقل نیستند لذا به عنوان یک رپلیکون^{۱۲۶} در نظر گرفته نمی شوند و بایستی با جزئی از یک رپلیکون دیگر مانند کروموزوم و یا پلاسمید تکثیر یابند. مطالعات نشان داده است منشاء بروز مقاومت ترانسپوزون ها می باشند، از آنجایی که ترانسپوزون ها نیاز به هم خوانی بالا با ژنوم گیرنده ندارد لذا به سادگی می تواند باعث بروز مقاومت در باکتری های مختلف شوند که غالباً به واسطه قرارگیری ترانسپوزون ها در پلاسمیدها روی می دهد (۶۷، ۶۸).

۱-۱۷-۸-۴ مقاومت ایتنگرونی

در سال ۱۹۹۵ دو دانشمند به نام های Hall و Colli این مکانیسم مقاومت را کشف کردند. ایتنگرون ها عناصر ژنتیکی متحرکی هستند که با قرارگیری در پلاسمید ها، کروموزوم ها و ترانسپوزون ها ژن های مقاومت را در حالیکه در داخل کاست های ژنی قرار دارند طی فرایند نوترکیبی اختصاصی در جایگاه (Site Specific Recombination) حمل و جابجا می کنند. ایتنگرون ها در ایجاد و توسعه مقاومت های دارویی چندگانه همانند پلاسمیدها و ترانسپوزون ها بسیار با اهمیت هستند. در سال های اخیر گزارشهایی مبنی بر نقش ایتنگرون ها در پلاسمید های واسط مقاومت به کینولون ها و بتالاکتام ها وجود دارد. ژن های *qnr* واسط مقاومت به کینولون ها به دلیل قرارگیری بر روی ایتنگرون های مختلف باعث گسترش سریع مقاومت

در بین انتروباکتریاسیه می شود از این رو ایتنگرون ها می توانند نقش مهمی در مقاومت به کینولون ها داشته باشند (۶۷-۶۹).

۱-۱۷-۹ انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی

فاکتورهای متفاوتی همچون انتقال ژنهای مقاومت بین باکتری ها، جهش در ژنهای مقاومت و افزایش فشار محیطی در انتشار مقاومت و افزایش بروز مقاومت نقش دارند. عناصر ژنتیکی به واسطه مکانیسم های مختلفی در میان باکتری ها انتقال می یابند که از این روش ها می توان کونژوگاسیون^{۱۲۷}، ترانسداکشن^{۱۲۸} و ترانسفورماسیون^{۱۲۹} را نام برد (۶۷، ۶۸).

۱-۱۷-۹-۱ مکانیسم کونژوگاسیون

این روش برای اولین بار توسط لدربرگ و تاتوم^{۱۳۰} معرفی شد. این دانشمندان پی بردند که با مخلوط کردن سویه های مختلف اشیریشیا کلی سویه های جدیدی بوجود می آید که هیچ تشابهی با سویه های والدینی خود ندارند و این گونه نتیجه گرفتند که این سویه ها DNA را در بین یکدیگر منتقل نموده و فنوتیپ جدیدی را در نسل جدید از خود بروز دادند که دارای خصوصیات مشترکی با سلول های اجدادی خود می باشد، مطالعات بعدی ثابت نمود که این روش انتقال شایع ترین مکانیسم انتقال مقاومت می باشد (۶۷، ۶۸). در این مکانیسم نیاز به تماس نزدیک بین سلول دهنده و سلول گیرنده ژنوم می باشد، این مکانیسم انتقال در باکتری هایی همچون اشیریشیا کلی، پseudomonas شناسایی شده است، سویه دهنده یا F^+ دارای فاکتور باروری^{۱۳۱} بر روی پلاسمید می باشند که ژن های لازم جهت انتقال را حمل می کنند. سویه F^+ دارای پیلی جنسی^{۱۳۲} می باشد که از طریق آن به سلول گیرنده (F^-) متصل و دو سلول در تماس نزدیک با هم قرار می گیرند و ژنوم مورد نظر

^{۱۲۷}Conjugation
^{۱۲۸}Transduction
^{۱۲۹}Transformation
^{۱۳۰}Lederberg & Tatum
^{۱۳۱}Fertility factor
^{۱۳۲}Sex pili

از این طریق انتقال می یابد. در طی این فرایند پلاسمید باکتری دهنده همانند سازی کرده و یک کپی از پلاسمید سلول والد را به سلول گیرنده می فرستد. در طی این همانند سازی DNA را به صورت تک رشته ای به سلول گیرنده می فرستد سپس هر کدام از تک رشته ها در سلول فرستنده و گیرنده به عنوان الگو برای تکثیر رشته مکمل استفاده و DNA دو رشته ای می شود. در این مکانیسم انتقال ژنومی امکان انتقال ژن های کروموزومی نیز وجود دارد، در صورت الحاق فاکتور F در داخل کروموزوم باعث انتقال ژن های کروموزومی مجاورش می شود که حتی امکان انتقال کل کروموزوم نیز وجود دارد که این سویه ها را Hfr^{۱۳۳} گویند (۶۸، ۶۷).

۱-۱۷-۹-۲ مکانیسم ترانسداکشن

در این مکانیسم ژن های باکتری توسط ویروس های باکتریایی (باکتریوفاز)^{۱۳۴} از یک سلول به سلول دیگر انتقال می یابد. باکتریوفاز حاوی ژنوم DNA و یا RNA می باشد که در هنگام آلودگی باکتری با فاز ژنوم را به داخل سلول تزریق می کند ژنوم فاز یا به صورت لیتیک^{۱۳۵} عمل نموده و سلول را وادار به تکثیر ژنوم ویروسی و تولید پروتئین های کپسیدی نموده و سپس با لیز سلول آلوده آزاد می شود یا در مسیر لیزوژنیک^{۱۳۶} DNA فاز وارد ژنوم باکتری شده و به عنوان بخشی از ژنوم پذیرنده تکثیر می شود که این نوع فازهای لیزوژن را فازهای معتدل^{۱۳۷} گویند. این فازهای معتدل می توانند القاء شده و از ژنوم باکتری جدا شوند که وارد فاز لیتیک شده که باعث لیز باکتری می شود که در طی این فرایند می تواند بخش هایی از ژنوم میزبان را همراه خود برداشته و به باکتری دیگر انتقال دهد (۶۷، ۶۸).

۱-۱۷-۹-۳ مکانیسم ترانسفورماسیون

High frequency recombinant	۱۳۳
Bacteriophage	۱۳۴
Lytic pathway	۱۳۵
Lysogen	۱۳۶
Temperate	۱۳۷

این مکانیسم شامل جذب و الحاق ژنوم برهنه به داخل سلول می‌باشد که طی این مکانیسم ژنوم برهنه پس از جذب به واسطه فرایند نو ترکیبی^{۱۳۸} به ژنوم باکتری ملحق می‌شود و در صورتی که پلاسمید باشد در صورت تطابق با سلول گیرنده در داخل سیتوپلاسم تکثیر می‌یابد. سلول‌های خاصی توانایی جذب DNA برهنه را دارند که این سلول‌ها را صلاحیت دار^{۱۳۹} گویند. پنوموکوک، مننگوکوک، هموفیلوس آنفولانزا و گنوکوک بطور طبیعی قادر به جذب DNA برهنه هستند و برخی سلول‌ها مثل اشیریشیا کلی و انتروکوک‌ها پس از صلاحیت‌دار شدن قادر به جذب می‌باشند (۶۷، ۶۸).

۱-۱۷-۱۰ مقاومت به کینولون‌ها

فعالیت وسیع کینولون‌ها بر علیه عفونت‌های مختلف و استفاده گسترده این آنتی بیوتیک‌ها و سوء مصرف و استفاده غیر ضروری از آن‌ها به خصوص در کشورهای در حال توسعه باعث سرعت افزایش مکانیسم‌های مقاومت به آن‌ها شده است. مقاومت به کینولون‌ها حتی از زمانی که نالیدیکسیک اسید در بیش از ۴۰ سال پیش وارد پزشکی بالینی شد، به عنوان یک مشکل مطرح بود، چنان‌چه با افزایش استفاده از کینولون‌ها از سال ۱۹۷۰ مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها در حال افزایش است. در دهه ۱۹۹۰ استفاده از فلئوروکینولون‌ها در ایالات متحده تقریباً ۴۰٪ افزایش یافت که دو برابر شدن میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در بین باسیل‌های گرم منفی جدا شده از بیماران ICU را در پی داشت. در ایالات متحده بیش از ۱۰٪ از باکتری‌های روده‌ای مثل انتروباکتر کلواکه، مورگانلا مورگانی، پروتئوس میرابیلیس و سریشیا مارسسنس به سیپروفلوکساسین مقاوم شدند. میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در پسودوموناس آئروژینوزا و پاتوزن‌های گرم منفی غیر روده‌ای بالاتر بود. طی سال‌های ۱۹۹۷-۱۹۹۹ تقریباً ۶۰٪ از سویه‌های *E. coli* جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی در بیجینگ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. در شانگ‌های چین میزان مقاومت

به سیپروفلوکساسین در *E. coli* به بیشتر از ۵۰٪ رسیده است، مقاومت به فلئوروکینولون ها در درمان گنوره آ و درمان عفونت های روده ای ناشی از سالمونلا، شیگلا و گونه های کمپیلوباکتر مشکل ایجاد کرده است. این مکانیسم های مقاومتی از نظر بالینی مهم هستند چون درطول درمان فاکتور با اهمیتی در محدود کردن مصرف این عوامل ضد میکروبی محسوب می شوند (۶۵).

۱-۱۷-۱۰-۱ مکانیسم های مقاومت به کینولون ها

مقاومت دارویی ممکن است در ارتباط با یک گونه خاص و یا درون یک جنس که به طور نرمال نسبت به یک عامل ضد میکروبی حساس بوده اند، به دنبال موتاسیون یا انتقال ژن های مقاومت بروز کند ژن های مقاومت از مسیرهای گوناگون و مکانیسم های متنوع به میکروارگانیسم اجازه بروز مقاومت نسبت به اثر مهارکنندگی یک ترکیب آنتی باکتریال را می دهند. مکانیسم های عمده مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کینولونی شامل موارد زیر می باشد: ۱- موتاسیونی که در جایگاه هدف دارو ها اتفاق می افتد ۲- موتاسیونی که تجمع دارو را کاهش می دهد (کاهش برداشت) ۳- مقاومت پلاسمیدی (۷۰).

۱-۱۷-۱۰-۱ موتاسیونی که در جایگاه هدف دارو ها اتفاق می افتد

رایج ترین مکانیسمی که سطوح قابل توجهی از مقاومت بالینی به فلئوروکینولون ها را ایجاد می کند، تغییرات در آنزیم های توپوایزومراز هست. این تغییرات به وسیله ی جهش های خود به خودی ایجاد می شوند که درون ژن های مسئول اتفاق می افتند. مقاومت شامل جانشینی اسید آمینه در ناحیه ای از زیر واحد GyrA یا ParC می باشد. در GyrA و ParC، جهش های مرتبط با مقاومت اغلب در منطقه ای در انتهای آمینی آنزیم شامل جایگاه فعال تیروزین متمرکز است که به صورت کووالان به رشته ی DNA شکسته مرتبط می باشد. این منطقه ی ۱۳۰ bp از *gyrA*، به عنوان منطقه ی تعیین کننده مقاومت کینولون در نظر گرفته شده است (QRDR).

این ناحیه در سطح اتصال DNA به آنزیم قرار دارد و آمینو اسید های بین موقعیت ۵۱-۱۰۶ در DNA ژیراز *E. Coli* را شامل می شود. موتاسیون های مقاومت در باکتری های گرم منفی در ژن *gyrA* رخ

می دهد، اما در باکتری های گرم مثبت در ژن *parC* رخ می دهد . موتاسیون اولیه در DNA ژیراز، حساسیت ارگانسیم گرم منفی را کاهش می دهد و موتاسیون های بعدی در ژن *gyrA* یا *gyrB* و یا *parC* می تواند میزان مقاومت را افزایش دهد. جانشینی در یک یا دو جایگاه در نواحی *E. Coli* QRDR، اتصال کینولون به کمپلکس DNA ژیراز را کاهش می دهد. موتاسیون های متناوب ممکن است عملکرد آنزیم هدف را معیوب کنند، بنابراین تشکیل کمپلکس های آنزیم - DNA کاهش پیدا می کند و دو رشته ی معیوب در DNA می شکنند (۷۰،۷۱) . رایج ترین منطقه موتاسیون در *E. Coli*، سرین ۸۳ *GyrA* (یا سرین ۸۳ *GyrA* در گونه های دیگر و یا سرین ۸۳ در *ParC*) می باشد. که ممکن است به تریپتوفان، لوسین، آلانین و یا دیگر اسید آمینه ها تغییر کند (۶۶). نشان داده شده است که موتاسیون در دومن های اختصاصی *GyrB* و *ParE* هم منجر به مقاومت کینولونی می شود. هر چند از موتاسیون های *GyrA* و *ParC* کمتر رایج هستند (۷۰-۷۲).

در ایزوله های بالینی دومین موتاسیون از لحاظ فراوانی مربوط به کدون ۸۷ ژن *gyrA* می باشد. سوش ها با موتاسیون دوگانه در کدون های ۸۳ و ۸۷، MIC کینولون بالاتری دارند. این حقیقت برای میکروارگانسیم های گرم منفی دیگر مانند سیتروباکتر فروندی، پseudomonas آئروژینوزا، نيسيريا گونه ره آ صدق می کند (۷۰-۷۲).

در ژن *gyrB* باکتری *E. coli* جایگزینی هایی که باعث مقاومت به کینولون ها می شوند در موقعیت های ۴۲۶ (آسپاراتات - ۴۲۶ به آسپارژین) و ۴۴۷ (لیزین - ۴۴۷ با گلوتامیک اسید) رخ می دهند. جایگزینی در موقعیت ۴۲۶ به نظر می رسد که نسبت به هر کینولونی ایجاد مقاومت می کند. در حالیکه موتاسیون در موقعیت ۴۴۷ باعث افزایش میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید شده، اما حساسیت به کینولون های فلورینه شده را افزایش می دهد. در سالمونلا تیفی موریوم جایگزینی اسید آمینه سرین با تیروزین در موقعیت ۴۶۳ رابطه ای با ایجاد مقاومت نسبت به کینولون داشته است. جایگزینی دیگری در *E. coli* (گلايسين -

۷۸ با آسپارتیک اسید) به دست آمده از موتانت های مقاوم به کینولون هم در آزمایشگاه هم در ایزوله های بالینی مشخص گردیده است. یک جایگزینی در ژن *parC* در موتانت های *invitro* آزمایشگاهی شیگلا فلکسنری مشخص شده است که در موقعیت ۷۹ اثر می گذارد (آسپارتات اسید با آلانین). فقط یک جایگزینی (لوسین ۴۴۵ با هیستیدین) در ژن *parE* از یک موتانت آزمایشگاهی مقاوم به کینولون توصیف شده است، به علاوه این موتاسیون به نظر می رسد فقط بر روی MIC کینولون ها در حضور همزمان یک جهش در *gyrA* اثر می گذارد (۷۲-۷۰).

جدول ۴: موتاسیون در آمینو اسیدهای *GyrA*, *GyrB* (۷۰)

Codon ^a	Wild amino acid	Mutations described
GyrA		
51 ^b	Ala	Val
67 ^b	Ala	Ser
81	Gly	Cys, Asp
82 ^b	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106 ^b	Gln	Arg, His
GyrB		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu

جدول ۵: موتاسیون در زیر واحدهای ParC و ParE سویه های E.coli مقاوم به کوئینولون (۷۰)

Codon	Wild amino acid	Mutations described
ParC		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
ParE		
445	Leu	His

۱-۱۷-۱۰-۱-۲ موتاسیونی که تجمع دارو را کاهش می دهد (کاهش برداشت)

کاهش برداشت کینولون در ارتباط با دو فاکتور می باشد الف) افزایش در نفوذ پذیری باکتری به عامل ضد باکتریایی و ب) بیان بیش از اندازه پمپ های افلاکس (۷۰). کینولون ها ممکن است از دو راه وارد غشای خارجی شوند، یا از میان پورین ها یا از طریق انتشار از میان دو لایه فسفولیپیدی. درجه انتشار یک کینولون به طور زیادی بستگی به میزان آبگریز بودن آن دارد. باکتری های گرم منفی می توانند نفوذپذیری غشاء را با تغییر بیان پروتئین های پورین غشای خارجی تنظیم کنند مانند پروتئین های غشای خارجی OmpF, OmpA, OmpC در *E.coli* (۷۲-۷۰). کاهش در میزان بیان OmpF با افزایش مقاومت به بعضی از کینولون ها مرتبط بوده ولی روی MIC کینولون های دیگر مانند ترسوفلوکساسین یا پارفلوکساسین اثر نمی گذارد. در *E.coli* OmpC و OmpF پورین های غیر اختصاصی هستند و به مولکول های قطبی کوچک اجازه ورود می دهند. نقص در این پورین ها با مقاومت به آنتی بیوتیک مرتبط است (۷۰). بعضی مناطق کروموزومی مانند MarRAB که شامل سه ژن *marR* که پروتئین ممانعت کننده را بیان می کند، *marA* که یک پروتئین فعال کننده رونویسی را کد می کند و *marB* که یک پروتئین با عملکرد ناشناخته ای را کد

می کند، این سه ژن هم میزان بیان *OmpF* و هم میزان بیان پمپ افلاکس را در *E. coli* تنظیم می کند و همچنین اپرون *SoxRS* نیز دو پروتئین را کد می کند، *SoxR* که یک پروتئین تنظیم کننده می باشد، *SoxS* که یک پروتئین فعال کننده رونویسی می باشد، که این دو پروتئین هم همانند ژن های قبلی میزان بیان *OmpF* و پمپ افلاکس را در *E. coli* تنظیم می کند (۷۰). همچنین اپران های *MarRAB* و *SoxR* در *E. coli* میزان بیان سیستم پمپ های برون ریز مانند *AcrAB* را تنظیم می کنند موتاسیون هایی که با اثر بر *marR* بیان دائمی اپرون را القا می کنند و موجب ایجاد فنوتیپ چند مقاومتی می شوند (۷۰). در *E. coli* پمپ افلاکس *AcrAB-Tolc* نقش مهمی در انتشار کینولون ها به خارج سلول ایفا می کند. موتاسیون در ژن *acrR* فعالیت پمپ را افزایش می دهد. پseudomonas آئروژینوزا چهار پمپ افلاکس دارد که می تواند کینولون ها و سایر مواد ضد میکروبی را به خارج سلول بفرستد (۷۰). سیستم های افلاکس مختلفی که کینولون را به خارج پمپ می کنند در pseudomonas آئروژینوزا مانند *MexAB-MexEF-OprN*، *MexCD-Oprj*، *OprM* شناسایی شده اند. در سال های اخیر یک پمپ افلاکس وابسته به پلاسمید (*QepA*) در میان سویه های انتروباکتریاسیه شناسایی شده است. این پمپ فلوروکینولون های هیدروفیلیک (سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین و نورفلوکساسین) را دفع می کند (۷۰).

چهارمین سیستم برون ریز با نام *MexXY* که توانایی پمپ کردن کینولون ها به خارج را دارد نیز شناسایی شده است. در استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت به کوئینولون با افزایش بیان ژن *norA* همراه است، ژنی که کدکننده یک ناقل برای کینولون ها و سایر عوامل است (۷۲). *NorA* یک پمپ برون ریز وابسته به *ATP* است که توانایی خارج کردن کینولون های مانند انوکساسین یا نورفلوکساسین را داشته اما بر روی کینولون های آبگریز مانند پارفلوکساسین اثر ندارد. اخیرا پاچرون و همکارانش که باسوش های سالمونلا تایفی موریوم حاوی آمینواسید های جایگزین شده در *GyrA*، *ParC* و *GyrB* کار می کنند، نشان داده اند که پمپ برون ریز *AcrAB* ارتباط زیادی با ایجاد مقاومت به کینولون در سالمونلا تایفی موریوم دارد (۷۳-۷۵).

جدول ۶: پمپ های افلاکس مسئول مقاومت در باکتری های گرم مثبت (۷۰).

Microorganism	Efflux system
<i>B. subtilis</i>	Blt BmrA Bmr3
<i>S. aureus</i>	NorA
<i>S. pneumoniae</i>	PmrA

جدول ۷: پمپ های افلاکس مسئول مقاومت در باکتری های گرم منفی (۷۰).

Microorganism	Efflux system
<i>A. baumannii</i>	AdeABC
<i>C. jejuni</i>	CmeABC
<i>E. coli</i>	AcrAB ^a AcrEF EmrAB MdfA YdhE
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM MexCD-OprJ MexEF-OprN MexXY-OprM
<i>S. maltophilia</i>	SmeDEF
<i>Vibrio cholerae</i>	VceAB
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NorM

۱-۱۶-۱۰-۳ مقاومت پلاسمیدی

مقاومت های پلاسمیدی شامل سه مکانیزم می باشد: ۱- مقاومت به کینولون ها به واسطه پروتئین های Qnr

(quinolone resistance) ۲- پروتئین AAC (6')-Ib-cr ۳- پروتئین QepA

علاوه بر مقاومت های کروموزومی اخیرا مقاومت کینولون ها بوسیله پروتئین های QNR کد شده توسط

پلاسمید ها گزارش شده است که با DNA ژیراز و توپوایزومراز IV واکنش داده و منجر به کاهش فعالیت

کینولون ها می شود. این پلاسمید ها نیز می توانند به طور مستقیم باعث مقاومت به کینولون شوند.

مقاومت به کینولون به واسطه پلاسمید مدت زمانی زیادی نیست که وجود دارد ، اولین بار در یک ایزوله

بالینی کلبسیلا پنومونیه در آلاباما کشف شد که سطح پایینی از مقاومت به کینولون را در *E.coli* و سایر

باکتری های گرم منفی ایجاد می کرد . به دلیل اینکه پلاسمید روی غلظت داخل سلولی کینولون ها یا بیان

پورین های غشای خارجی اثر ندارد و به دلیل اینکه پلاسمید، مقاوت را در سویه های *E.coli* که موتاسیون در ژن های *ompC, ompF, parC, gyrB, gyrA* یا *marR* داشته اند را افزایش می دهد، یک مکانیسم جدید مقاومت پیشنهاد شد. ژن های *qnr* پروتئین های پنتا پتیدی را کد می کند که عملکرد آنتی بیوتیک روی DNA ژیراز و توپوایزومراز را مهار می کند (۷۸-۷۶). ژن *qnr* در بیش از ۳۰۰ سویه گرم منفی جمع آوری شده در طی دهه ۱۹۹۰ یافت نشد. تنها استثنا شامل سویه های جمع آوری شده طی یک دوره ۶ ماهه در سال ۱۹۹۴ در دانشگاه آلاباما در بیرمنگام، جایی که اولین بار ژن *qnr* تشخیص داده شد، بود. همچنین ژن *qnr* در ایزوله های *E.coli* در شانگهای چین یافت شد که این ایزوله ها مقاومت بالایی به سیپروفلوکساسین داشتند. اگر چه پلاسمید های شانگهای و آلاباما که حامل ژن *qnr* بودند کاملاً متفاوت بودند، ژن های آن ها تقریباً یکسان بود، تنها با تغییرات تک نوکلئوتیدی که توالی اسید های آمینه را تغییر نمی دهد. اولین مقاومت وابسته به پلاسمید در سال ۱۹۹۸ از کلبسیلا پنومونیه در برمنگهام جدا شد (۷۰). این ژن ۲۱۸ اسید آمینه را کد کرده که بعداً *qnr A* نامیده شد. اخیراً گروه های دیگری شامل *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnr D* و *qnr VC* (با زیر گروه های مختلف از جمله *qnr A1* و *qnr A2* و... که در چند اسید آمینه متفاوتند) شناخته شده است (۷۸،۷۰). پروتئین خالص شده Qnr به هر دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ متصل می شود و آن ها را از اثر مهری سیپروفلوکساسین محافظت می کند. معمولاً پلاسمید های حامل ژن *qnr*، ژن های *ESBL* مانند *CTM-9* یا *SHV-7* و ژن های *AmpC* بتالاکتاماز مانند *FOX-5* را نیز کد می کنند. این ارتباط می تواند یکی از دلایل فراوانی بالای مقاومت به کینولون در باکتری های مولد *ESBL* باشد. در پلاسمید هایی که مورد مطالعه قرار گرفته اند، *qnr* در انتگرون یا ساختار اینتگرون مانند در نزدیکی یک عنصر به نام *Orf513* نقشه برداری شده است. این موقعیت نشان می دهد که *qnr* از منابع دیگر کسب شده است اما منشا آن هنوز شناخته نشده است دو عضو دیگر از پروتئین های خانواده پنتاپتیدی که کمتر از ۲۰٪ شباهت آمینو اسیدی دارند پس زیاد با *qnr* مرتبط

نیستند ولی حداقل در عملکرد با *qnr* مرتبط هستند شامل McbG که یکی از پروتئین های تولید شده توسط سویه های سازنده microcineB17 می باشد که DNA ژیراز را هدف قرار می دهد. اعتقاد بر این است که McbG، DNA ژیراز را از خود مهار می محافظت می کند، همچنین حساسیت به تعدادی از کینولون ها را کاهش می دهد. پروتئین دیگر که مرتبط با *qnr* می باشد، MfpA که یک پروتئین کلون شده از ژنوم مایکوباکتریوم اسمگماتیس است که یک اثر ۴ برابری در حساسیت به سیپروفلوکساسین دارد. در سال ۲۰۰۵ دومین مکانیزم وابسته به پلاسمید که با تغییر در مولکول آنتی بیوتیک عمل می کند شناخته شد. پروتئین aaC(6')-Ib-cr که واریانته از ۶ استیل ترانسفراز است باعث ایجاد تغییر در ساختمان شیمیایی آمینو گلیکوزید ها شده و یک فعالیت آنزیمی وسیع روی سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین دارد (۷۸). سومین مکانیزم مقاومت پلاسمیدی اخیرا در *E. Coli* جدا شده از ژاپن مشاهده شده است ، و منجر به شناسایی ژن *qepA* شد که پروتئین *qepA* را کد کرده و به عنوان پمپ افلاکس کینولون عمل می کند (۷۸).

فصل دوم

بررسی متون

۲-۱ بررسی متون

. مطالعه ای که توسط سلیمانی اصل (Soleimani-Asl) و همکارانش در سال ۱۳۹۱ در خرم آباد بر روی مجموعه ۱۴۰ ایزوله *E.coli* مقاوم به کینولون ها انجام شد، شیوع *qnrA* را با روش PCR بررسی شد و تشخیص داده شد که از مجموع ۱۴۰ ایزوله، ۱۱۶ (۸۲/۸٪) ایزوله و ۶۳ (۴۳٪) ایزوله به ترتیب مقاوم به نالیدیکیک اسید و سیپروفلوکساسین هستند و ۱۴ (۱۲/۱٪) ایزوله از ایزوله های *E.coli* مقاوم به نالیدیکیک اسید و ۹ (۱۴/۳٪) ایزوله از ایزوله های *E.coli* مقاوم به سیپروفلوکساسین حاوی ژن *qnrA* هستند (۷۹).

. در مطالعه ای که توسط نادری نسب (Naderi Nasab) در سال ۲۰۱۱ در بیماران بستری در بیمارستان امام رضا مشهد بر روی ۲۰۰ ایزوله بالینی *E.coli* از لحاظ شیوع ژن *qnr* و *ESBLs* انجام شد، مشخص گردید که از مجموع ۲۰۰ ایزوله، ۶۳ (۳۱٪) ایزوله حاوی ژن *qnrA* و ۳۴ (۱۷٪) ایزوله حاوی ژن *qnrB* و ۱۴ (۷٪) ایزوله حاوی ژن *qnrS* می باشد. ۸۵ (۴۲/۵٪) ایزوله تولید کننده *ESBLs* هستند (۸۰).

. فیروزی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در ایران بر روی مجموعه ۱۴۰ ایزوله *E.coli* از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری میزان شیوع *qnrA*، *qnrB* را به وسیله PCR مورد بررسی قرار داده شد، از مجموعه ۱۴۰ ایزوله، ۱۱۶ (۸۲/۸٪) ایزوله مقاوم به نالیدیکیک اسید و ۶۳ (۴۵٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشند. از میان ایزوله های مقاوم به نالیدیکیک اسید ۱۴ (۱۲/۱٪) ایزوله حامل ژن های *qnrA* و ۹ (۷/۸٪) ایزوله حامل ژن های *qnrB* می باشد و از میان ایزوله های مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۴ (۲۲/۲٪) ایزوله حامل ژن های *qnrA* و ۹ (۱۴/۳٪) ایزوله حامل ژن های *qnrB* می باشد (۸۱).

در مطالعه ای که توسط Jeong و همکارانش (۲۰۱۱) بر روی ۳۴۷ ایزوله انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه های بالینی مختلف در کره انجام شد، میزان ژن *qnr* را بررسی کردند و مشخص شد که از ۳۴۷ ایزوله، ۴۷ (۱۳/۵٪) ایزوله از نظر حضور ژن *qnr* مثبت هستند، در ادامه با انجام PCR تشخیص داده شد که ۶

(۱۲/۷٪) ایزوله حاوی ژن *qnrA1*، ۴۰ ایزوله دارای ژنهای *qnrB* (۸۵/۱٪) و یک ایزوله نیز از نظر حضور ژن *qnrS1* (۲/۱٪) مثبت هستند، همچنین از مجموع ۴۷ ایزوله که از نظر حضور ژن *qnr* مثبت هستند، ۳۸ (۸۰/۸۵٪) ایزوله از لحاظ *ESBLs* نیز مثبت شده و در ۲۳ (۴۸/۹٪) ایزوله از همین گروه، ژن *DHA-1* که از ژن های *AmpC* بتالاکتامازها می باشد هم زمان مشاهده شد (۸۲٪).

در مطالعه ای که توسط Shyamala طی سال های ۲۰۱۱-۲۰۱۲ در هند بر روی مجموعه ۴۶۴ بیمار در بخش مراقبت ویژه انجام شد، مشخص شد که ۴۴ ایزوله کشت آنها از نظر *E.coli* مثبت شده و از مجموع ۴۴ ایزوله ۳۱ (۷۰/۴۵٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین هستند (۸۳٪).

در مطالعه ای که توسط Hassan و همکارانش در مصر در سال ۲۰۱۲ بر روی ۷۰ ایزوله بالینی *E.coli* انجام شد. میزان شیوع ژن *qnr* مورد بررسی قرار داده شد. مشخص شد از مجموع ۷۰ ایزوله، ۳۰ (۴۲٪) ایزوله تولیدکننده *ESBLs* هستند که از ۳۰ ایزوله، ۵ (۱۶/۶٪) ایزوله حاوی ژن *qnrA1*، ۷ (۲۳/۳٪) ایزوله حاوی ژن *qnrB1*، ۵ (۱۶/۶٪) ایزوله حاوی ژن *qnrS1* می باشند (۸۴٪).

Cai- و همکارانش (۲۰۱۱) در چین بر روی مجموعه ۱۷۹ باکتری گرم منفی شیوع *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* به وسیله PCR مورد بررسی قرار داده شد، و ژن *qnrA* را در ۳/۸٪ ایزوله *E.coli* و ۷/۶٪ ایزوله *E.cloacae* و ژن *qnrB* را در ۶/۲٪ ایزوله *E.coli* و ۷/۶٪ ایزوله *E.cloacae* و ژن *qnrS* را در ۲/۳٪ ایزوله *E.coli* و ۱۸/۹٪ ایزوله *K. pneumonia* تشخیص داده شد (۸۵٪).

Hee Kim- و همکارانش (۲۰۱۰) در بخش مراقبت ویژه بیمارستان در کره روی ۱۱۱ ایزوله کلینیکی *E.coli* و *K. pneumoniae* (۶۹ ایزوله *E.coli*، ۴۲ ایزوله *K. pneumoniae*) شیوع ژن *qnr* را در ایزوله های تولیدکننده *ESBLs* مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که شیوع *ESBLs* در *E.coli* ۱۷/۷٪ و در *K. pneumoniae* ۲۶/۵٪ می باشد، در میان ایزوله های تولید کننده *ESBLs*، ۴ (۵/۸٪) ایزوله *E.coli* و ۱۷ (۴۰/۵٪) ایزوله *K. pneumoniae* حاوی ژن *qnr* می باشد (۸۶٪).

-در مطالعه ای که توسط Vasilaki و همکارانش (۲۰۰۸) در یونان بر روی ۱۱۳ ایزوله *E.coli* مقاوم به سیپروفلوکساسین انجام شد میزان شیوع ژن *qnrS1* بررسی شد، و مشخص شد که از مجموع ۱۱۳ ایزوله، ۱۱ (۹/۷۳٪) ایزوله از لحاظ ژن *qnrS1* مثبت هستند (۸۷).

- در مطالعه ای که توسط پاکزاد و همکارانش (۲۰۱۱) در بیمارستان میلاد تهران بر روی ۱۵۰ ایزوله *E.coli* از لحاظ مقاومت کینولون ها و *ESBLs* انجام شد، مشخص شد ۴۲ (۲۸٪) ایزوله تولیدکننده *ESBLs* هستند و از میان ۴۲ ایزوله، ۹ (۳۷/۵٪) ایزوله حاوی ژن *qnrA* و ۴ (۲۰/۸٪) ایزوله حاوی ژن *qnrB* هستند (۸۸).

فصل سوم

مواد و روش کار

۳-۱ اهداف و فرضیات

۱-۳-۱ هدف اصلی

تعیین فراوانی ژن های مقاومت به کینولون ها وابسته به پلاسمید *qnr* در ایزوله های بالینی *E.coli* جدا شده از بخش های مراقبت ویژه بیمارستان های قزوین ، کرج و تهران

۲-۳-۱ اهداف فرعی

۱. تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های *E.coli* نسبت به مجموعه داروهای خانواده

کینولون ها (سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، گتی فلوکساسین ، لووفلوکساسین

و افلوکساسین) بر اساس نوع نمونه کلینیکی، شهر، بیمارستان

۲. تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) سیپروفلوکساسین به روش آگار دایلوژن در ایزوله های

E.coli مقاوم به فلئوروکینولون ها بر اساس نوع نمونه کلینیکی، شهر، بیمارستان

۳. تعیین فراوانی ژنوتیپ های *qnrA qnrB qnrS* در ایزوله های *E.coli* مقاوم به کینولون ها به

روش PCR بر اساس نوع نمونه کلینیکی، شهر، بیمارستان

۴. مقایسه نتایج فنوتیپیک با ژنوتیپیک

۳-۳-۱ اهداف کاربردی

کینولون ها در درمان بیماری های عفونی از جمله عفونت های ادراری مورد استفاده قرار می گیرند. پلاسمید

های واسط مقاومت به کینولون ها (*qnr*) که شایع ترین مکانیسم مقاومت می باشد، به دلیل قرار گیری بر روی

پلاسمیدهای انتقالی قابلیت انتشار و انتقال مقاومت به کینولون ها را از طریق کانژوگاسیون در بین گونه های

باکتریها تسهیل می کند. از آنجایی که الگوی مقاومت دارویی دارای توزیع جغرافیایی، منطقه ای و حتی

بیمارستانی می باشد. لذا تعیین الگوی مقاومتی سویه های *E.coli* جدا شده از عفونت های بیمارستانی به

ویژه بخش مراقبت های ویژه به روش فنوتیپی و تعیین فاکتور های ژنتیکی آن در این سویه هامی تواند در تعیین رژیم درمانی مناسب برای بیماران و ارایه نتایج آن به کمیته های کنترل عفونت بیمارستان ها از جهت کنترل سویه های دارای مقاومت چند گانه و همچنین بررسی های اپیدمیولوژی موثر باشد .

۱-۳-۴ فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش

۱- فراوانی مقاومت فلونئوروکینولون ها در بین ایزوله های *E.coli* جدا شده از نمونه های بیماران بستری ICU چگونه است ؟

۲- فراوانی ژن *qnrS qnrB qnrA* در بین ایزوله های *E.coli* جدا شده از نمونه های بیماران بستری ICU چگونه است ؟

۳- آیا ژنهای *qnr* در بروز مقاومت نسبت به کینولون ها در ایزوله های *E.coli* مقاوم از آمار قابل توجهی برخوردار است؟

۲-۳ مواد و روش ها

۲-۳-۱ نوع مطالعه: اپیدمیولوژیک مولکولی-توصیفی و معیار های ورود به مطالعه شامل موارد زیر است :

۱-نمونه های ارسالی که از نظر رشد گونه های *E.coli* مثبت باشد.

و معیار های خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد :

۱-نمونه های ارسالی که نتیجه کشت آن ها سایر باکتری های به جزء گونه های *E.coli* باشد.

۲- بیمارانی که نمونه های ارسالی آن ها تکراری باشد.

۳- نمونه های بیماران سرپایی

۳-۳ تعداد نمونه و روش نمونه گیری

جامعه ی مورد مطالعه ، کلیه سویه های *E.coli* که از نمونه های بالینی بیماران بستری شده در بخش های

مراقبت ویژه در آزمایشگاه های بیمارستان های آموزشی قزوین و تعدادی از بیمارستانهای کرج و تهران

جدا شده است ، می باشد . این عدد با توجه به شیوع ۲۵ درصد در فلئوروکینولون ها و شیوع ۱۲ درصد در ژن

مقاومت qnr و ضریب اطمینان ۹۵ درصد و دقت ۰/۰۷ حجم نمونه ۱۴۶ بدست می آید.

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1-P)}{d^2} = 146$$

اما از آنجایی که مطالعه مرتبط با پایان نامه فوق بر روی ۲۴۰ ایزوله *E.coli* انجام گرفته است . لذا مطالعه

حاضر نیز با این تعداد نمونه انجام خواهد گرفت .

جدول ۸ : جدول متغیرها

عنوان متغیر	مست قل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
بیمارستان	✓				✓		بیمارستان آموزشی قزوین و تعدادی از بیمارستانهای کرج و تهران	
نوع کلینیکی	✓				✓		براساس نوع نمونه ایی که سویه <i>E.coli</i> آن جدای شود	
مقاومت به فلئوروکینولونها		✓			✓		با استفاده از تست آنتی بیوگرام و اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد	حساس / حدواسط / مقاوم، میلی لیتر

حدافل غلظت مهاری سیپروفلوکساسی ن	✓			✓	تعیین حدافل غلظت ممانعت از رشد با استفاده از روش آگار دیلوشن	میکروگرم/میلی لیتر
انواع ژن های <i>qnr</i>	✓			✓	انجام PCR و انجام الکتروفورز محصول PCR انجام الکتروفورز و بکارگیری سائز مارکرهای مربوطه و مشاهده چشمی باند	حضور دارد/ندارد

۳-۳-۱ نمونه برداری

تعداد ۲۴۰ نمونه از سویه های *E.coli* که از نمونه های بالینی بیماران بستری شده در بخش های مراقبت ویژه در آزمایشگاه های بیمارستان های آموزشی قزوین و تعدادی از بیمارستانهای کرج و تهران طی ۱۸ ماه جمع آوری گردید. ایزوله های باکتریایی از نمونه های بالینی ادرار، تراشه، خون و زخم جمع آوری شدند. ایزوله های جداسازی شده در آزمایشگاه های بیمارستان ها بر روی دو محیط بلاداآگار و EMB پاساژ داده شده و به گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده

شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، توسط آزمایش های بیوشیمیایی مربوط به شناسایی جنس *E.coli* مورد بررسی قرار گرفتند .

۳-۴ تست های بیوشیمیایی

تست های بیوشیمیایی که برای شناسایی *E.coli* مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از :

۱. کشت بر روی محیط مکانکی آگار
۲. رنگ آمیزی گرم
۳. انجام آزمون اکسیداز
۴. کشت بر روی محیط (TSI)^{۱۴۰}
۵. آزمایش اندول (کشت بر روی محیط SIM)
۶. آزمایش متیل رد (کشت بر روی محیط MR-VP)
۷. آزمایش ووگس پروسکوئر (کشت بر روی محیط MR-VP)
۸. آزمایش سیترات (کشت بر روی محیط سیمون سیترات)
۹. آزمایش اوره (کشت بر روی محیط اوره آگار)
۱۰. تست حرکت (کشت بر روی محیط SIM)

E.coli همان گونه که گفته شد باسیل گرم منفی، اکسیداز منفی، لاکتوز مثبت است که در محیط TSI سطح و عمق محیط را اسیدی و زرد کرده و همراه با تولید گاز می باشد. اندول و MR مثبت داشته و واکنش VP و سیترات منفی می باشد و هم چنین متحرک است. تست هیدرولیز اوره در *E.coli* منفی است (۸۹).

^{۱۴۰} Triple suger iron :TSI

بعد از تعیین هویت ایزوله ها به منظور نگهداری طولانی مدت باکتری ها، ابتدا آن ها را در ویال های حاوی محیط تریپتی کیز سوی برات (TSB)^{۱۴۱} کشت داده و بعد از انکوباسیون در دمای 37°C ، در صورت رشد باکتری یک یا دو قطره گلیسرول ۲۰٪ استریل به آن اضافه کرده و سپس تا زمان انجام تست های مطالعه در فریزر 20°C - نگهداری شدند.

۳-۵ تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش Disk Diffusion

برای انجام آزمون از دستور العمل موسسه بین المللی استاندارد های آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد و به شرح زیر انجام شد (۸۹):

۱- ابتدا محیط مولر هینتون آگار تهیه شد و pH آن بین $7/2$ تا $7/4$ تنظیم گردید. این پلیت ها، برای کنترل آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. محیط مولر هینتون آگار از شرکت Merch آلمان خریداری شدند.

۲- در مرحله ی بعد، ظروف حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، گتی فلوکسازین، لووفلوکساسین و افلوکساسین برای انجام آزمون، از فریزر 70°C - (نگهداری بلند مدت) به یخچال 4°C (نگهداری کوتاه مدت) انتقال داده شوند. چند دقیقه قبل از انجام تست نیز ظروف حاوی دیسک ها در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق برسند. دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند.

۳- در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت انجام آزمون تهیه می شود. از آن جا که برای تهیه سوسپانسیون، از سویه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از کشت آن ها نگذشته باشد استفاده می شود، لذا نمونه

^{۱۴۱} Triptocase soy Broth : TSB

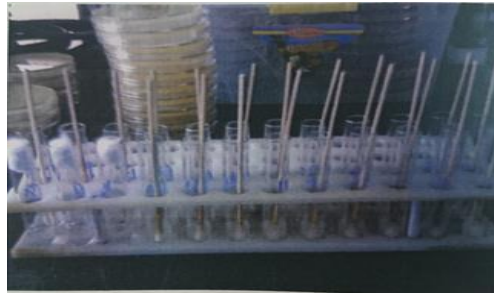
ها یک روز قبل از انجام آنتی بیوگرام بر روی محیط ژلوز ساده کشت داده می شوند. سپس در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می شوند. برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی به لوله حاوی ۲ ml سرم فیزیولوژی استریل ۵-۴ کلونی از کشت ۲۴ ساعته انتقال داده شده و بعد از مخلوط کردن با میکسر، کدورت سوسپانسیون به دست آمده با کدورت نیم مک فارلند (ضمیمه ۲) تطبیق داده می شود (شکل ۱۲).

۴- با استفاده از یک سواب کتان استریل سوسپانسیون را بر روی محیط مولر هیتون آگار تهیه شده (ضمیمه ۱) به روش چمنی کشت داده می شود. پانزده دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون دیسک های آنتی بیوتیکی ذکر شده که به دمای اتاق رسیده بودند، بر روی پلیت به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی متر از یکدیگر و هم چنین ۲/۵ سانتی متر از لبه پلیت قرار می دهیم.

۵- پس از قرار دادن دیسک ها پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه می شوند. سپس با استفاده از خط کش، قطر های عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج مربوطه در فرم های تهیه شده وارد می شوند.

۶- طبق دستور العمل CLCI، ایزوله هایی که قطر هاله عدم رشد نالیدیکسیک اسید ($30\mu\text{g}$) ≥ 13 میلی لیتر، دیسک سیپروفلوکساسین (5μ) ≥ 15 میلی لیتر، دیسک گتی فلوکساسین (5μ) ≥ 14 میلی لیتر، دیسک نورفلوکساسین (10μ) ≥ 12 میلی لیتر، دیسک لووفلوکساسین (5μ) ≥ 13 و دیسک افلوکساسین (5μ) ≥ 12 میلی لیتر باشد به عنوان ارگانیزم مقاوم محسوب می شوند.

۷- در این مطالعه مطابق با پیشنهاد CLSI برای کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیکی از سویه استاندارد اشريشیاکلی ۲۵۹۲۲ ATCC به عنوان سویه کنترل، و برای کنترل کیفی محیط کشت مولر هیتون آگار از سویه استاندارد انتروکوکوس فکاليس ۲۹۲۱۲ ATCC استفاده گردید.



شکل ۱۲: تهیه سوسپانسیون میکروبی و کشت روی محیط مولر هیتون آگار

۳-۶ تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) با روش آگار دایلوشن

تعیین حداقل غلظت مهاري به روش آگار دایلوشن طبق توصیه موسسه استاندارد آزمایشگاه های (CLSI) بالینی برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین انجام گرفت. در این آزمون مطابق با جدول کنترل کیفی CLSI از سویه استاندارد *E.coli* ATCC 35218 برای انجام کنترل کیفی آزمایش استفاده شد. تعیین MIC با روش آگار دایلوشن برای ایزوله های غیر حساس به سیپروفلوکساسین مطابق با دستورالعمل CLSI به شکل زیر انجام و تفسیر شد (۸۹).

۱. آماده کردن محلول های استوک آنتی بیوتیک

برای تعیین MIC سیپروفلوکساسین از پودر سیپروفلوکساسین (Fluca) با درجه خلوص ۹۸، با استفاده از فرمول های زیر مقدار پودر مورد نیاز و حجم استوک اولیه محاسبه شد.

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{volum (ml)} \times \text{concentration} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)}{\text{potency} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)}$$

ابتدا پودر سیپروفلوکساسین (Fluca، سوئیس) را وزن کرده و به حجم رساندیم. در این مرحله از آب مقطر استریل به عنوان حلال و رقیق کننده استفاده شد. تعداد رقت های مورد نیاز با توجه به دستورالعمل CLSI مشخص و سریال هایی از رقت های مختلف تهیه کردیم. برای این منظور ابتدا محلول استوک سیپروفلوکساسین به غلظت ۵۱۲ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد. بعد از استریل کردن بوسیله فیلتر، در

حجم های ۱ میلی لیتری در میکروتیوپ های استریل پخش شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده و از آن جهت ساخت محلول کاری به غلظت $512000 \mu\text{g/ml}$ در زمان آزمایش استفاده شد. سپس در هنگام آزمایش از این محلول کاری رقت های کاهنده دو برابر از غلظت ۵۱۲۰۰۰ تا غلظت ۲۵ آماده کردیم و از آن در مرحله بعد برای تهیه پلیت های حاوی مولر هیتون آگار آنتی بیوتیک دار با غلظت ۵۱۲ تا ۰/۲۵ استفاده شد. کلیه مراحل کار با استفاده از وسایل استریل و تحت شرایط آسپتیک انجام گرفت.

۲. تهیه کردن پلیت های آگار حاوی آنتی بیوتیک

برای هر رقت آنتی بیوتیکی، محیط مولر هیتون آگار (Merch آلمان) بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آماده شد (pH: ۷/۴-۷/۲). پس از اتوکلاو و قرار دادن محیط در بن ماری با دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتی گراد، محلول سیپروفلوکساسین در غلظت های مختلف زمانی که آگار تا دمای مورد نظر خنک شد به آگار اضافه گردید برای این منظور به هر ۹۹ میلی لیتر آگار یک میلی لیتر از محلول های آنتی بیوتیکی با غلظت های مختلف که در مرحله قبل آماده شده بود اضافه و سپس روی یک سطح صاف درون پلیت ها ریخته شد تا عمق آگار به ۳-۴ میلی لیتر رسید که بعد از خنک شدن در دمای اتاق در یخچال نگهداری شدند. برای جلوگیری از کاهش اثر آنتی بیوتیک بهتر است هر چه زودتر استفاده شود.

۳. آماده کردن سوسپانسیون میکروبی و تلقیح آن

ابتدا از نمونه ها یک سوسپانسیون میکروبی دارای کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند ($10^8 \times 1-2$) تهیه گردید سپس به میزان ۱۰:۱ با سالین رقیق شد که تقریباً معادل ($10^7 \times 1$) است سپس از این سوسپانسیون باکتریایی بعد از مخلوط کردن مقدار ۲ میکرولیتر با استفاده از میکروپیپت برداشته و بر روی محیط مولر هیتون آگار قرار دادیم. تلقیح نهایی روی آگار تقریباً معادل 10^4 CFU در هر نقطه می باشد. کلیه مراحل در شرایط کاملاً آسپتیک انجام شد. بعد از تلقیح نمونه ها پلیت ها در دمای ۳۵-۳۷ درجه

ساتی گراد بمدت ۱۶-۲۰ ساعت انکوبه شد کلیه مراحل فوق بر روی یک پلیت فاقد آنتی بیوتیک بعنوان کنترل مثبت نیز انجام گرفت. هم چنین در هر پلیت خانه ای برای سویه استاندارد و کنترل منفی که تلقیح میکروبی در آن انجام نمی شود در نظر گرفته شد.

۴. تفسیر نتایج

بعد از اتمام مدت گرمخانه گذاری پلیت ها از انکوباتور خارج گشته و بر اساس رقت هایشان از رقت کم به سمت زیاد ردیف شدند. MIC هر سویه با ارزیابی رشد باکتری در نقطه تلقیح صورت گرفته و کمترین غلظت آنتی بیوتیک که مانع از رشد باکتری شده است بعنوان حداقل غلظت مهارى آنتی بیوتیک مورد آزمایش در آن سویه در نظر گرفته شد. لازم بذکر است رشد تنها یک یا دو کلنی بعنوان رشد مثبت در نظر گرفته می شود.

جدول ۹: تفسیر نتایج MIC سیپروفلوکساسین بر حسب $\mu\text{g/ml}$

مقاوم R	حدواسط I	حساس S
≥ 4	۲	≤ 1

مطابق با جدول شماره ۷ و بر اساس CLSI سویه هایی که MIC آن ها کمتر یا مساوی $1 \mu\text{g/ml}$ باشد حساس، سویه هایی که MIC آن ها $2 \mu\text{g/ml}$ باشد حدواسط و سویه هایی که MIC آن ها بیشتر و یا مساوی $4 \mu\text{g/ml}$ باشد بعنوان مقاوم در نظر گرفته شدند (۸۹).



شکل ۱۳: پودر MIC سیپروفلوکساسین

۳-۷ مقاومت سطح بالا و پایین بر اساس دیسک دیفیوژن و آگار دیلوژن

در بررسی مقاومت سطح بالا و پایین با روش دیسک دیفیوژن در صورت مقاومت به دیسک های نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین به طور همزمان مقاومت سطح بالا High level و در صورتی که مقاومت به دیسک های نالیدیکسیک اسید و مقاومت حدواسط و یا حساسیت به دیسک های سیپروفلوکساسین مشاهده شود مقاومت در سطح پایین Low level نامیده می شود، و همچنین در بررسی مقاومت سطح بالا و پایین با روش آگار دیلوژن، سویه هایی که MIC آن ها در محدوده $\mu\text{g/ml}$ ۲-۴ باشند مقاومت در سطح پایین low level و سویه هایی که MIC آن ها در محدوده $\mu\text{g/ml}$ ۴-۱۶ باشند مقاومت حدواسط Intermediat level و سویه هایی که MIC آن ها در محدوده $\mu\text{g/ml}$ ۳۲-۱۲۸ باشند مقاومت سطح بالا High level نامیده می شوند (۶۶، ۸۹).

۳-۸ بررسی مولکولی مقاومت به فلئوروکینولون ها

برای تعیین شیوع ژن های *qnrA*, *qnrB*, *qnrB4* و *qnrS* از پرایمرهای اختصاصی طبق جدول ۳ استفاده شد، که با تکثیر ژن مورد نظر در شرایطی که گفته خواهد شد و در نهایت الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز حضور یا عدم حضور آن ها مشخص گردید.

مراحل انجام آزمون مولکولی عبارتند از:

۱- استخراج DNA

۲- انجام آزمون PCR

۳- الکتروفورز

۱-۸-۳ استخراج DNA

مراحل استخراج DNA با استفاده از روش boiling صورت گرفت:

۱- برای استخراج DNA به روش boiling از کلنی حاصل از کشت تازه (۲۴ ساعته) استفاده شد. برای این منظور نمونه هایی را که در آزمون فنوتیپی به آنتی بیوتیک های کینولونی حساس نبودند برای استخراج DNA کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C سویه های مورد نظر آماده استخراج گردید.

۲- ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ml حاوی $200\mu\text{l}$ آب مقطر استریل حل شدند.

۳- با استفاده از شیکر نمونه ها را shake کرده تا این که کاملاً حل شدند.

۴- ویال ها را به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (100°C)، قرار داده به طوری که سطح آب جوش دو سوم ویال را در بر گیرد.

۵- سپس ویال ها به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند (شکل ۱۳).

۶- محلول رویی (سوپرناتانت) ویال ها که حاوی DNA می باشد، به عنوان DNA الگو برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شدند.

۷- در این مرحله پس از استخراج، برای اطمینان از وجود DNA توتال، از دستگاه نانودراپ در دو طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر استفاده شد.

استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و برای حصول به نتایج بهتر در PCR، DNA استخراج شده ذخیره نمی شد.



شکل ۱۴: دستگاه میکروسانتریفیوژ مورد استفاده در مطالعه حاضر

۲-۸-۳ آماده سازی پرایمر ها

۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه نیز برگرفته از پرایمرهای مورد استفاده در مطالعات قبلی می باشد ولیکن به جهت اطمینان از اتصال اختصاصی این پرایمرها از برنامه BLAST در بانک ژنی NCBI^{۱۴۲} استفاده گردید. پس از حصول اطمینان از توالی های مورد نظر، سنتز پرایمرهای انتخابی توسط شرکت MacroGene - Korea صورت پذیرفت. پرایمرها پس از طراحی به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره بر طبق دستورالعمل (برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.

۲- در مرحله بعد وسایل های حاوی پرایمر، به مدت ۰/۵ ساعت در دمای $^{\circ}\text{C} 37$ قرار گرفتند.

۳- محلول استوک پرایمر به غلظت $100 \mu\text{mol}$ تهیه و سپس در دمای $^{\circ}\text{C} -20$ نگهداری شدند.

بسته به کار روزانه برای تهیه محلول کاری پرایمر با غلظت $10 \mu\text{mol}$ از هر دو رشته فوروارد و ریورس تهیه و برای هر سری از واکنش های PCR استفاده شد.

جدول ۱۰: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR

ژن	سایز bp	توالی پرایمر	رفرنس
<i>qnrA(1-6)</i>	۵۶۴	F : 5 - ACG CCAGGATTTGAGTGAC -3 R: 5-CCAGGCACAGATCTTGAC – 3	۸۶
<i>qnrB(1,3,5,6,8)</i>	۴۳۰	F : 5- GGC ACT GAA TTT ATC GGC - 3 R : 5 - TCC GAA TTG GTC AGA TCG - 3	۸۶
<i>qnrS(1-2)</i>	۶۰۸	F: 5- CCTACAATCATACAT ATCGGC - 3 R: 5 - GCTTCGAGAATCAGTTCTTGC - 3	۸۶
<i>qnrB4</i>	۳۵۸	F : 5- AGTTGTGATCTCTCCATGGC - 3 R : 5- CGGATATCTAAATCGCCCAG -3	۸۶

۳-۸-۳ انجام آزمون PCR

در این مرحله ابتدا Mastermix تهیه شد (جدول ۹)، سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و شناسایی ژن های مورد نظر صورت گرفت. برای انجام واکنش های PCR، حجم نهایی هر واکنش ۲۵ میکرو لیتری بود. برای به دست آوردن بهترین مقدار ترکیبات مورد استفاده (مثل $MgCl_2$)، گرادیانی از مقادیر مختلف این ترکیبات، طی چند واکنش مختلف PCR انجام شد.

جدول ۱۱: مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرو لیتر)
dNTP mix 10 mmol	۲
PCR Buffer 10X	۱۰
MgCL2 50 mmol	۳
D,H2O	۷۳
Total Volum Mastermix	۸۸

آماده سازی واکنش PCR:

با در نظر گرفتن حجم نهایی هر واکنش PCR که ۲۵ میکرولیتر بود، حجم پرایمر ها، DNA الگو و میزان آنزیم پلیمرز که باید به Mastermix اضافه شوند به شرح ذیل (جدول ۱۲) آمده است.

جدول ۱۲: مواد مولکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
Mastermix	۲۱/۷۵
DNA Template	۱
Primer F	۱
Primer R	۱
Taq pol 5 u/μl	۰/۲۵
Total	۲۵

- برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور آمریکا): پس از قرار دادن ویال ها در دستگاه ترموسایکلر، شرایط دمایی مختلف و زمان های آن ها در یک واکنش PCR برای ژنوتیپ های مورد نظر که در جدول ۱۳ ذکر شده اجرا گردید (شکل ۱۵).

جدول ۱۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر در واکنش PCR برای ژن های مورد نظر

ژن	جداسازی اولیه	جداسازی	اتصال پرایمرها (Annealling)	دمای بسط (extention)	(Final Extensin) دمای بسط نهایی
<i>qnrA1-6</i>	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۵۳ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه
<i>qnrB1-3,5,6,8</i>	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۵۵ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه
<i>qnrS1-2</i>	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۴۹ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه
<i>qnrB4</i>	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۴۹ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه



شکل ۱۵: دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور آمریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر

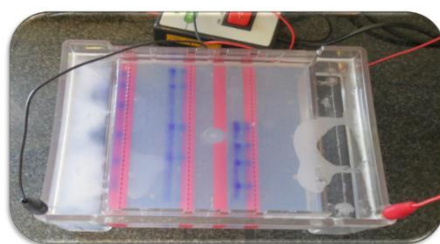
۳-۸-۴ الکتروفورز محصولات PCR

برای انجام الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

تهیه بافر TBE 1X: برای تهیه بافر TBE 10X، مواد مندرج در ضمیمه با مقادیر مربوطه مخلوط و حجم نهایی محلول به ۱ لیتر رسانده شد. سپس بافر TBE1X (ضمیمه ۴ و ۳) از بافر 10X تهیه و از آن در تانک الکتروفورز و تهیه ژل استفاده گردید.

الکتروفورز:

به میزان ۱ گرم پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی لیتر TBE 1X حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک شدن به میزان ۱ میکرولیتر (10 µg/ml) سایبر گرین (برای رنگ آمیزی DNA) به آن اضافه کردیم. پس از مخلوط کردن، محلول را داخل قاب ریخته و پس از بسته شدن ژل، آن را در قالب خارج کرده و به داخل تانک الکتروفورز انتقال دادیم. مقدار ۷ میکرولیتر از محصول PCR را با ۳ میکرولیتر Loading Buffer 6 X مخلوط کرده و داخل چاهک های ژل برای الکتروفورز قرار دادیم. برای انجام الکتروفورز، ولتاژ روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید، وقتی نمونه سه چهارم طول ژل را طی کرد، ژل را از تانک خارج و با دستگاه UV مشاهده شد. در صورت مناسب بودن باندهای حاصل از الکتروفورز، ژل را با دستگاه UVP مورد مشاهده قرار داده و از تصویر ژل مربوطه عکس تهیه شد (شکل ۱۶ و ۱۷).



شکل ۱۶: تانک الکتروفورز مورد استفاده در مطالعه حاضر



شکل ۱۷: دستگاه Gel- Documentation مورد استفاده در مطالعه حاضر

۳-۹ تعیین توالی (sequencing)

محصول PCR هریک از ژن ها جداگانه (*qnrB4, qnrB, qnrS*) از نظر تایید حضور ژن توسط شرکت ژن فن اوران به شرکت MacroGene (کره جنوبی) ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی با نرم افزار Choromas بررسی و سپس جهت انالیز ابتدا در NCBI، blast شده و با ژن های سویه های استاندارد ثبت شده در این بانک ژنی alignment انجام شد.

بررسی ارتباط بین حضور ژن های مذکور و مقاومت آنتی بیوتیکی:

پس از جمع آوری داده ها یافته ها در قالب جداول فراوانی نمودار شاخص های عددی ارائه گردید برای تحلیل داده ها از آزمون مجذور کای و تست دقیق فیشر استفاده شد. داده ها به وسیله نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ تجزیه و تحلیل شد. مقدار P valu کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد

فصل چهارم

نتایج ویافته ها

۱-۴ جمع آوری نمونه

تعداد ۲۴۰ نمونه *E.coli* ارسالی به آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستان های تهران، قزوین و کرج از اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲ تا آبان ماه سال ۱۳۹۳ جمع آوری گردید و در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی با انجام آزمون های استاندارد میکروب شناسی و آزمایشگاهی مورد تایید قرار گرفتند.



شکل ۱۸: واکنش های بیوشیمیایی جنس *E.coli*، لوله ۱: محیط TSI واکنش اسید / اسید با تولید گاز، لوله ۲: محیط SIM کدورت پخش شده نشانه ی تحرک مثبت و قرمز نشدن در مجاورت معرف کواکس نشانه ی اندول منفی، لوله ۳: واکنش MR مثبت. لوله ۴: واکنش VP منفی، لوله ۵ واکنش سیترات منفی در محیط سیمون سیترات است. لوله ۶: واکنش MR منفی. لوله ۷: واکنش VP مثبت

در این مطالعه، ۱۶۹ (۷۰/۴٪) از ایزوله های *E.coli* از بیماران زن و ۷۱ (۲۹/۶٪) از بیماران مرد جداسازی شدند. همانطور که در جدول ۱۳ مشاهده می شود ایزوله های *E.coli* اکثراً از نمونه های کلینیکی ادرار جدا شدند (۹۴/۲٪)

جدول ۱۴: فراوانی ایزوله های *E.coli* جدا شده بر اساس نوع نمونه های بالینی جدا شده از بیماران

نوع نمونه	فرآوری	ک	ن	ا	ت
تعداد ایزوله های جدا شده	۶	۲	۲۲۶	۶	
درصد ایزوله های جدا شده	۲,۵%	۰,۸%	۹۴,۲%	۲,۵%	
تعداد کل	۲۴۰				

همانطور که در جدول شماره ۱۵ آمده است بیشتر نمونه ها در این مطالعه از شهر کرج جداسازی شدند

(۱۹۳-۸۰/۴۱٪). در این بین بیشترین نمونه ها از بیمارستان امام (۵۲ - ۲۱/۶۶٪) جداسازی شدند.

جدول ۱۵: توزیع فراوانی ایزوله های *E.coli* به تفکیک بیمارستان ها

شهر		کرج														قزوین				تهران			
بیمارستان	فراوانی	امام	البرز	کسری	رجایی	مدنی	شریعتی	امام علی	کوثر	قدس	رازی	بوعلی	رجایی	دی	بوعلی	شهداء	امام						
		۵۲	۴۳	۵۰	۳۸	۴	۳	۳	۸	۷	۴	۱۲	۳	۹	۲	۱	۱						
تعداد ایزوله های جدا شده		۵۲	۴۳	۵۰	۳۸	۴	۳	۳	۸	۷	۴	۱۲	۳	۹	۲	۱	۱						
درصد ایزوله های جدا شده		۲۱/۶۶	۱۷/۹۱	۲۰/۸۳	۱۵/۸۳	۱/۶۶	۱/۲۵	۱/۲۵	۳/۳	۲/۹۱	۱/۶۶	۵	۱/۲۵	۳/۷۵	۰/۸۳	۰/۴۱	۰/۴۱						
تعداد ایزوله های جدا شده		۱۹۳														۳۴				۱۳			
درصد ایزوله های جدا شده		۸۰/۴														۱۴/۱				۵/۴			
تعداد کل		۲۴۰																					

۲-۴ الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

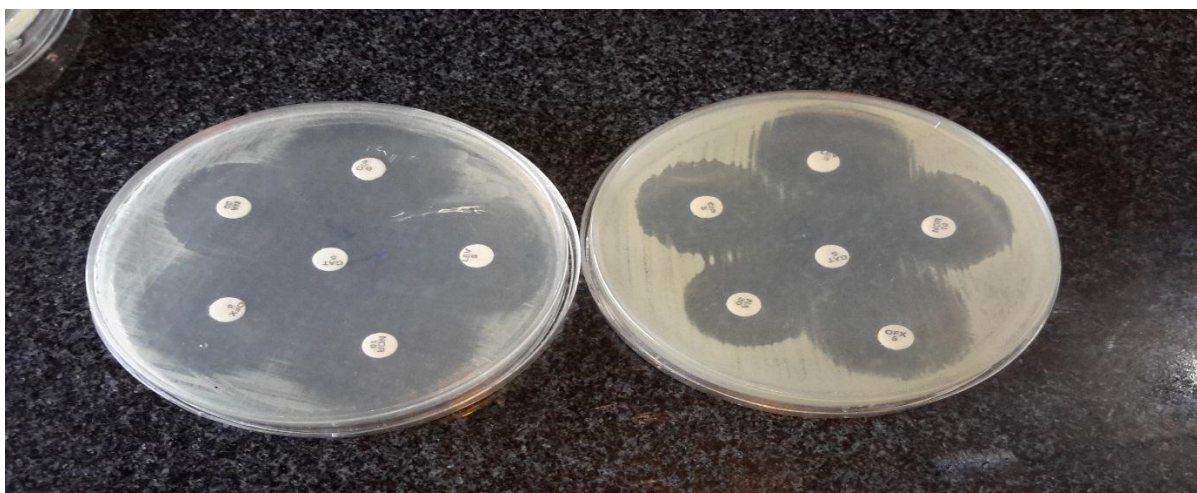
نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن اگر (DAD) طبق دستورالعمل موسسه

استاندارد روش های آزمایشگاهی (CLSI) برای آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، نور

فلوکساسین، گتی فلوکساسین، لووفلوکساسین و افلوکساسین در جدول ۱۸ آمده است. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت مربوط به نالیدیکسیک اسید (۶۳/۳٪) و سپس سیپروفلوکساسین (۵۵٪) می باشد. در مجموع ۱۵۲ ایزوله نسبت به یکی از انواع آنتی بیوتیک های خانواده کینولون بکار رفته در این مطالعه مقاومت کامل داشته و تعداد نمونه هایی که در آن ها مقاومت حد واسطه مشاهده می شود، کم می باشد که همه آن ها را جهت بررسی از نظر حضور مجموعه ژن های *qnr* با استفاده از آزمون PCR انتخاب کردند.

جدول ۱۶: حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های *E.coli* جمع آوری شده از بیمارستان های مورد مطالعه

نام دیسک	مقاوم (٪)	حساس (٪)	حد واسطه (٪)
نالیدیکسیک اسید	۱۵۲ (۶۳/۳)	۸۸ (۳۶/۶)	–
سیپروفلوکساسین	۱۳۲ (۵۵)	۱۰۳ (۴۲/۹)	۵ (۲)
لووفلوکساسین	۱۲۹ (۵۳/۸)	۱۰۳ (۴۲/۹)	۸ (۳/۳)
نور فلوکساسین	۱۲۸ (۵۳/۳)	۱۰۴ (۴۳/۳)	۸ (۳/۳)
گتی فلوکساسین	۱۲۵ (۵۲)	۱۰۶ (۴۴/۱)	۹ (۳/۸)
افلوکساسین	۱۳۰ (۵۴/۱)	۱۰۳ (۴۲/۹)	۷ (۲/۹)



شکل ۱۹: نتایج به دست آمده از ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها به روش دیسک دیفیوژن آگار

۲-۴-۱ مقاومت سطح بالا و سطح پایین

در این مطالعه از مجموع ۱۵۲ نمونه مقاوم به کینولون های مورد استفاده ، ۱۳۳ نمونه مقاومت سطح بالا و

۱۹ نمونه مقاومت سطح پایین را نشان دادند (جدول ۱۷).

جدول ۱۷: بررسی سطوح مقاومتی به کینولون های بکار رفته در این مطالعه

سطح مقاومت	مقاومت سطح بالا تعداد(%)	مقاومت سطح پایین تعداد(%)
فراوانی	۱۳۳ (۸۷/۵)	۱۹ (۱۲/۵)
تعداد کل	۱۵۲	

جدول ۱۸ : تعداد ایزوله های غیر حساس به کینولون ها به تفکیک شهر

شهر	تعداد ایزوله	درصد %
کرج	۱۲۵	۸۲/۲
تهران	۹	۵/۹
قزوین	۱۸	۱۱/۸
مجموع	۱۵۲	۱۰۰

۳-۴ نتایج حاصل از MIC در ایزوله های *E.coli* غیر حساس به سیپروفلوکساسین

نتایج حاصل از آزمون آگار دایلوژن برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در نمودار ۱ آورده شده است. در

این مطالعه رنج MIC بین ۱ تا ۲۵۶ گزیر شد.

از ۱۳۷ ایزوله غیر حساس به سیپروفلوکساسین ، ۱۴ (۱۰/۲٪) ایزوله مقاومت سطح پایین در محدوده ۴-

۲ μg/ml و ۹۱ (۶۶/۴٪) ایزوله مقاومت حدواسط به سیپروفلوکساسین و دارای MIC در محدوده ۱۶-

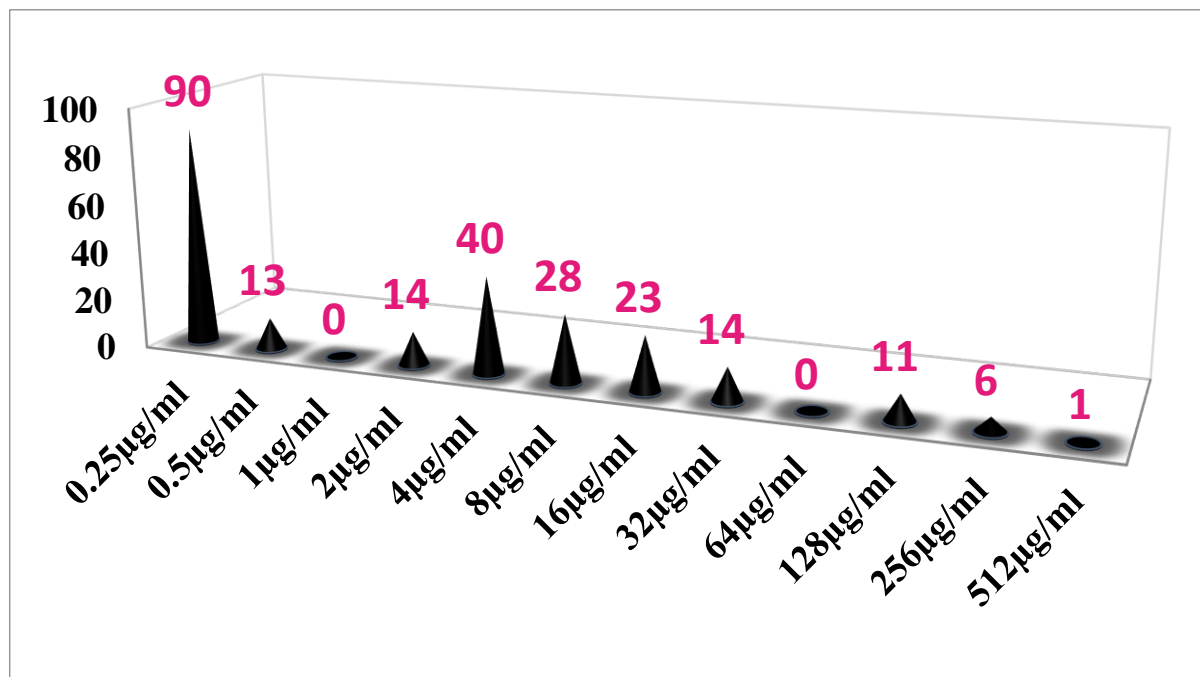
۴ μg/ml می باشند، و ۳۲ (۲۳/۳٪) ایزوله مقاومت سطح بالا و دارای MIC در محدوده ۱۲۸-۳۲ μg/ml

می باشند در سویه های غیر حساس MIC₅₀ ۸۰ μg/ml و MIC₉₀ ۱۲۸ μg/ml حاصل شد. از مجموع

۱۰۳ ایزوله حساس به سیپروفلوکساسین ۹۰ (۸۷/۳٪) ایزوله دارای MIC در محدوده ۰/۲۵ μg/ml و ۱۳

(۱۲/۶٪) ایزوله دارای MIC در محدوده ۰/۵ μg/ml می باشند.

نمودار ۱: توزیع فراوانی مقدار MIC سیپروفلوکساسین در ایزوله های *E.coli* جدا شده از ICU



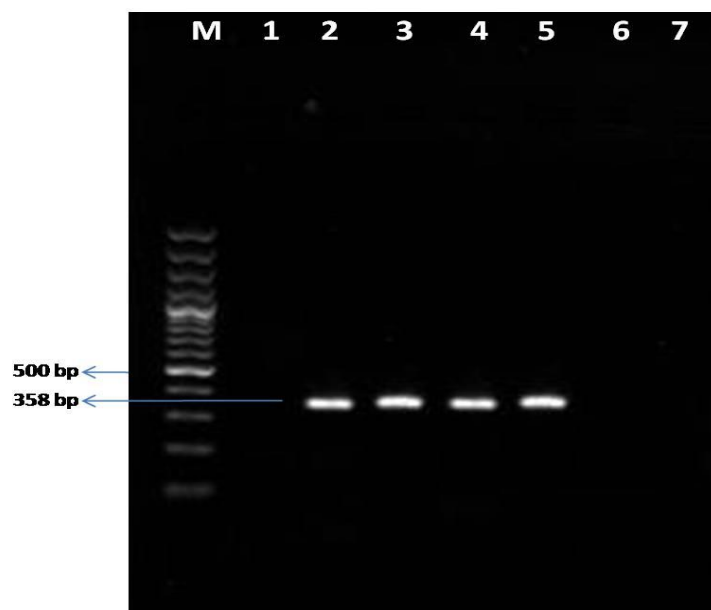
شکل ۲۰: روش آگار دایلوشن برای تعیین MIC در ایزوله های *E.coli* جدا شده از ICU

۴-۴ نتایج حاصل از جداسازی ژن های *qnr*

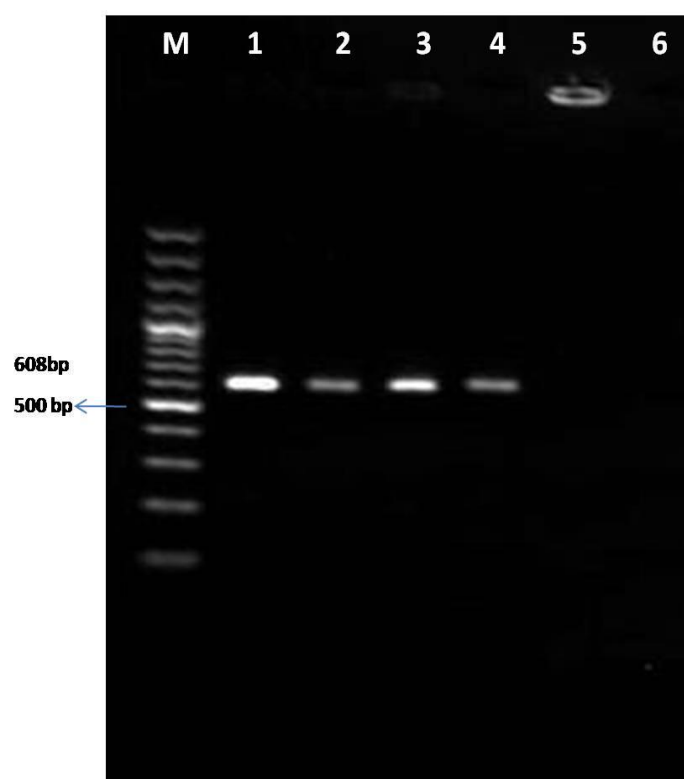
از مجموع ۱۵۲ ایزوله غیر حساس به کینولون های به کار رفته در این مطالعه، ۵۹ (۳۸/۸٪) ایزوله دارای ژن های با واسطه پلاسمیدی *qnr* ۵۴ شناسایی شدند، از میان ۵۹ ایزوله، ۵۴ (۳۵/۵٪) ایزوله حاوی ژن *qnrB4*، ۱۴ (۹/۲٪) ایزوله حاوی ژن *qnrS1* بودند، در حالی که هیچکدام از ایزوله ها حامل ژن *qnrA* و *qnrB* نبودند (جدول ۱۹).

جدول ۱۹: فراوانی ژن های *qnr* به واسطه پلاسمیدی در ایزوله های *E.coli* جدا شده از ICU در این مطالعه

ژن	تعداد ایزوله های مثبت	درصد
<i>qnrA</i>	۰	۰
<i>qnrB</i>	۰	۰
<i>qnrB4</i>	۴۵	۲۹/۶
<i>qnrS1</i>	۵	۳/۲
<i>qnrB4 + qnrS</i>	۹	۵/۹
مجموع	۵۹	



شکل ۲۱: نتایج PCR از نظر حضور ژن *qnrB4*. M: DNA مارکر. ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون ۲: کنترل مثبت؛ ۳ تا ۵: ایزوله های مثبت بالینی؛ ستون ۶: ایزوله بالینی منفی؛ ستون ۷: واکنش PCR بدون DNA الگو



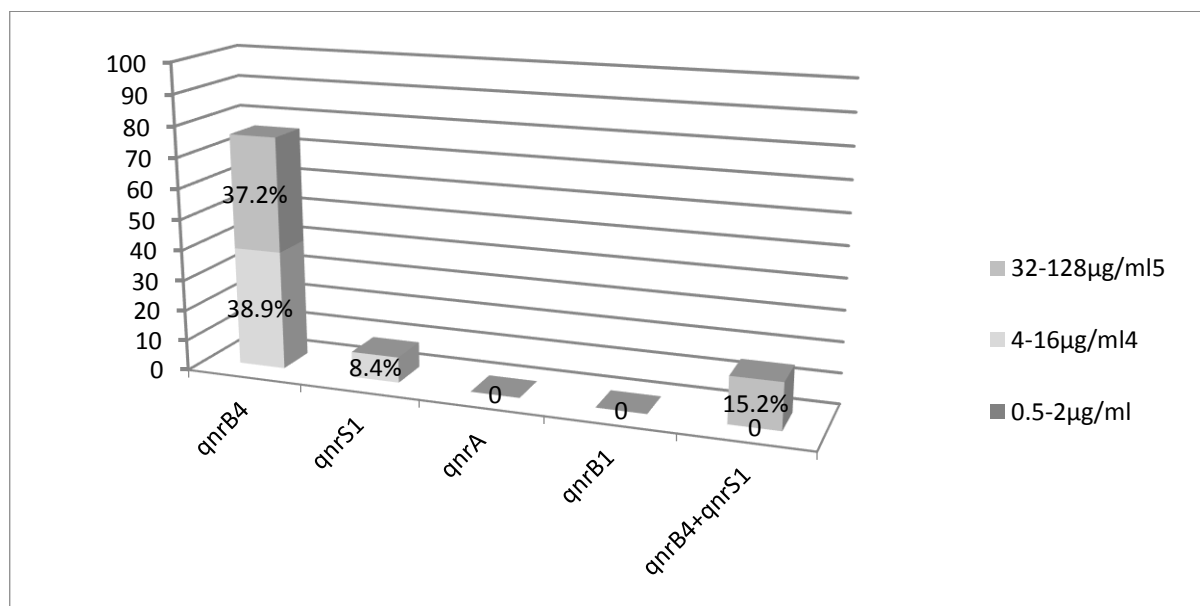
شکل ۲۲: نتایج PCR از نظر حضور ژن *qnrS*. M: DNA مارکر. ستون ۱: کنترل مثبت؛ ستون ۲ تا ۴: نمونه بالینی مثبت؛ ستون ۵: واکنش PCR بدون DNA الگو؛ ستون ۶: کنترل منفی

جدول ۲۰: بررسی سطوح مقاومتی به کینولون ها و حضور ژن های *qnr* بر اساس مقادیر MIC سیپروفلوکساسین

<i>qnr</i> genes	۰/۲۵ μg/ml	۰/۵-۲ μg/ml	۴-۱۶ μg/ml	۳۲-۱۲۸ μg/ml	مجموع
<i>qnrB4</i>	–	–	(٪ ۳۸/۹)۲۳	(٪ ۳۷/۲)۲۲	۴۵
<i>qnrS1</i>	–	–	(٪ ۸/۴)۵	–	۵
<i>qnrA</i>	–	–	–	–	–
<i>qnrB</i>	–	–	–	–	–
<i>qnrB4+qnrS1</i>	–	–	–	(٪ ۱۵/۲)۹	۹
			(٪ ۴۷/۱)۲۸	(٪ ۵۲/۵)۳۱	۵۹

بر اساس جدول ۲۰ از مجموع ۵۹ ایزوله *E.coli* حامل ژن های *qnr* ، ۲۸ (٪ ۴۷/۱) ایزوله MIC آن ها در محدوده ۴-۱۶ μg/ml می باشند و دارای مقاومت حدواسط و ۳۱ (٪ ۵۲/۵) ایزوله میزان MIC در محدوده ۳۲-۱۲۸ μg/ml می باشند و دارای مقاومت سطح بالا به سیپروفلوکساسین هستند.

نمودار ۲: مقایسه MIC سیپروفلوکساسین با ایزوله های *E.coli* حامل ژن *qnr*



در این مطالعه از مجموع ۵۹ ایزوله حامل ژن *qnr* همه نمونه ها مقاومت سطح بالا دارند یعنی هم به سیپروفلوکساسین و هم به نالیدیکسیک اسید مقاوم هستند و نمونه هایی که مقاومت سطح پایین دارند که تعداد آن ها محدود است حامل ژن *qnr* نمی باشند. که در جدول زیر مشخص شده است.

جدول ۲۱: بررسی سطوح مقاومتی و حضور ژن های *qnr* بر اساس دیسک های نالیدیکیسک اسید و سیپروفلوکساسین

سطح مقاومت حضور ژن <i>qnr</i>	مقاومت سطح بالا High level تعداد (%)	مقاومت سطح پایین Low level تعداد (%)
وجود ژن <i>qnr</i>	۵۹ (۱۰۰)	-
عدم وجود ژن <i>qnr</i>	۷۴ (۷۹/۵)	۱۹ (۲۰/۴)

۵-۴ نتایج حاصل از تعیین توالی

نتایج تعیین توالی محصولات PCR ژن های مورد مطالعه نشان داد که توالی های مورد بررسی بعد از blast

از یکسانی و تشابه توالی بالایی برخوردار بودند. سکانس ایزوله هایی که حامل ژن های *qnrS* بودند، نشان

داد که همه آن ایزوله ها دارای *qnrS1* بودند. نتایج alignment ژن های *qnrB4*, *qnrS1* با ژن های

سویه های استاندارد ثبت شده در NCBI در شکل های ۲۳، ۲۴ آورده شده است.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
qnr-S-F	CACATATTTTCGTAAAGACTTA-GTGATCTCACCTTCACCGCTTGCACATTCATTTCGACGCGACTTTCGACGTGCTAACTTGCCTGATACGACATTCGTCACACTGCAAGTTCATTGACACGGGTGATATCG													
qnr-S1	AAAGACTTAAGTGATCTCACCTTCACCGCTTGCACATTCATTTCGACGCGACTTTCGACGTGCTAACTTGCCTGATACGACATTCGTCACACTGCAAGTTCATTGACACGGGTGATATCG													
ConsensusAAAGACTTA-GTGATCTCACCTTCACCGCTTGCACATTCATTTCGACGCGACTTTCGACGTGCTAACTTGCCTGATACGACATTCGTCACACTGCAAGTTCATTGACACGGGTGATATCG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
qnr-S-F	AAGGCTGCCACTTTTGATGTCGAGATCTTCGATGTCAGAGTTCCACACATGCCAATTCGATGGCAACTTCAGTAAAGCCAAATTCGACGGTATAGAGTTCCGTCGCTGTGATTTAAAGGTGCCAA													
qnr-S1	AAGGCTGCCACTTTTGATGTCGAGATCTTCGATGTCAGAGTTCCACACATGCCAATTCGATGGCAACTTCAGTAAAGCCAAATTCGACGGTATAGAGTTCCGTCGCTGTGATTTAAAGGTGCCAA													
Consensus	AAGGCTGCCACTTTTGATGTCGAGATCTTCGATGTCAGAGTTCCACACATGCCAATTCGATGGCAACTTCAGTAAAGCCAAATTCGACGGTATAGAGTTCCGTCGCTGTGATTTAAAGGTGCCAA													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
qnr-S-F	CTTTTCCCGAACAACTTTGCCCATCAAGTGAGTATCGTATGACTTTTGCACGACTTATTCTCGATGTAATCTTCCATATGCCAATATGGAGAGGGTTGTTAGAAHAATGTGAGTTGTTTGA													
qnr-S1	CTTTTCCCGAACAACTTTGCCCATCAAGTGAGTATCGTATGACTTTTGCACGACTTATTCTCGATGTAATCTTCCATATGCCAATATGGAGAGGGTTGTTAGAAHAATGTGAGTTGTTTGA													
Consensus	CTTTTCCCGAACAACTTTGCCCATCAAGTGAGTATCGTATGACTTTTGCACGACTTATTCTCGATGTAATCTTCCATATGCCAATATGGAGAGGGTTGTTAGAAHAATGTGAGTTGTTTGA													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
qnr-S-F	AATCGTGGATAGGACGACCTAGCGGGTGCATCACTGAAGAGTCAGACTTAAGTCAGGGTGTCTTTCGAGATGCTGGGGGCAATTTAGCCTACAGGGTGCCATTTATGCCACGCCGACCTCG													
qnr-S1	AATCGTGGATAGGACGACCTAGCGGGTGCATCACTGAAGAGTCAGACTTAAGTCAGGGTGTCTTTCGAGATGCTGGGGGCAATTTAGCCTACAGGGTGCCATTTATGCCACGCCGACCTCG													
Consensus	AATCGTGGATAGGACGACCTAGCGGGTGCATCACTGAAGAGTCAGACTTAAGTCAGGGTGTCTTTCGAGATGCTGGGGGCAATTTAGCCTACAGGGTGCCATTTATGCCACGCCGACCTCG													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
qnr-S-F	ACGGTTAGATCCCCGAAAGTCGATACATCAGGTATCAAAATTCAGCCTGGCAGCAGAACTGTTCTGAAGAAAAAAGAGTGTGTTTATGAGGGGGTCTTGTATAAAAAAGAG													
qnr-S1	ACGGTTAGATCCCCGAAAGTCGATACATCAGGTATCAAAATTCAGCCTGGCAGCAGAACTGTTCTGAAGAAAAAAGAGTGTGTTTATGAGGGGGTCTTGTATAAAAAAGAG													
Consensus	ACGGTTAGATCCCCGAAAGTCGATACATCAGGTATCAAAATTCAGCCTGGCAGCAGAACTGTTCTGAAGAAAAAAGAGTGTGTTTATGAGGGGGTCTTGTATAAAAAAGAG													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
qnr-S-F	AATACTTATTATAAATGAAAAACCAAGGACCAATATAC													
qnr-S1	AATACTTATTATAAATGAAAAACCAAGGACCAATATAC													
Consensus	AATACTTATTATAAATGAAAAACCAAGGACCAATATAC													

شکل ۲۳: توالی ژن *qnrS1*

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
qnrB4	-----														
MansouriB4	ATTGGCTGCCAGTTTATGATCGAGAAAGTCAGAAAGGATGTAATTTTAGTCGCGCTAACCTGAAGATGCCATTTTCAAAAGTTGTGATCTCTCCATGGCTGATTTCAGGAATATCAATGCGCTGGGA														
ConsensusAGATCTATCTCTCCATGGCTGATTTCAGGAATATCAATGCGCTGGGA														
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
qnrB4	-----														
MansouriB4	TCGAATTCGCCACTGCCGGGCACAGGGTCAGATTTTCGCGGCGCAGTTTTATGAATATGATCACCCCGCACCTGGTTTTGTAGCGCTATATCACCATACCACTTAACTACGCCAATTTTC														
Consensus	TCGAATTCGCCACTGCCGGGCACAGGGTCAGATTTTCGCGGCGCAGTTTTATGAATATGATCACCCCGCACCTGGTTTTGTAGCGCTATATCACCATACCACTTAACTACGCCAATTTTC														
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
qnrB4	-----														
MansouriB4	AAAAGTCGTACTGGAAAAGTGCAGCTGTGGGAAACCGCTGGATGGGTACTCAGGTGCTGGGCGCACGTTTCAGTGGATCAGACCTCTCTGGCGGCGAGTTTTCATCCTTCGACTGGCGAGCAGCAAC														
Consensus	AAAAGTCGTACTGGAAAAGTGCAGCTGTGGGAAACCGCTGGATGGGTACTCAGGTGCTGGGCGCACGTTTCAGTGGATCAGACCTCTCTGGCGGCGAGTTTTCATCCTTCGACTGGCGAGCAGCAAC														
	391	400	410	420	430	440	450	460							
qnrB4	-----														
MansouriB4	GTTACGCACTGTGATTTGACCAATTCGGAATGGGCGATTAGATATCCGGGGTTGATTTGCAGGGCG														
Consensus	GTTACGCACTGTGATTTGACCAATTCGGAATGGGCGATTAGATATAGT.....														

شكل ٢٤ : توالى ژن *qnrB4*

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

E.coli از جمله باکتری فرصت طلب دخیل در ایجاد عفونت های بیمارستانی است. این ارگانیسم شایعترین علت ایجاد عفونت های مجاری ادراری، مننژیت و سپسیس و عفونت های تنفسی به ویژه در بیماران بستری در بخش ICU می باشد این بیماران در معرض خطر بیشتری برای ابتلای به عفونت های بیمارستانی می باشند، به طوریکه تقریباً ۲۵٪ عفونت های بیمارستانی و ۹۰٪ طغیان ها در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان ها رخ می دهد (۴). لذا بخش های مراقبت ویژه از قسمت های خطیر بیمارستان می باشند و بیمارانی که در این بخش ها بستری می شوند دامنه وسیعی از اختلالات عملکردی و یا نقص در یک یا چند ارگان به ویژه سیستم های تنفسی و قلبی و عروقی دارند. از آنجایی که استفاده از کاتتر های وریدی و ادراری و دستگاه های کمک تنفسی به طور وسیع به کار گرفته می شود خطر ابتلا به عفونت ها افزایش می یابد (۳،۴،۶).

اگر چه کینولون ها یکی از رایج ترین آنتی بیوتیک های تجویزی برای درمان عفونت های ادراری ایجاد شده توسط *E.coli* و سایر اعضای انتروباکتریاسه می باشند، ولیکن توسعه مقاومت به این آنتی بیوتیک ها تصمیمات درمانی را مشکل کرده و ممکن است منجر به شکست درمان شود (۹۰،۹۱). سفالوسپورین ها داروهای رایج در درمان عفونت های بیماراران ICU محسوب می شوند و پلاسمیدهای حامل ژن های *qnr* می توانند به طور همزمان ژن های *ESBL* را حمل کنند، لذا مقاومت به سفالوسپورین ها می تواند در ایزوله های حاوی ژن های پلاسمیدی *qnr* دیده شود (۹).

فعالیت وسیع کینولون ها بر علیه عفونت های مختلف و استفاده گسترده این آنتی بیوتیک ها و سوء مصرف و استفاده غیرضروری از آنها به خصوص در کشورهای در حال توسعه باعث سرعت افزایش مکانیسم های مقاومت به آنها شده است، و با افزایش استفاده از کینولونها از سال ۱۹۷۰ مقاومت به این آنتی بیوتیک ها به

سرعت در حال افزایش است (۹۰، ۹۱). هر چند مقاومت نسبت به داروهای کینولونی بیشتر کروموزومی است اما در سال های اخیر مقاومت به واسطه پلاسمیدی در بین ایزوله های انتروباکتریاسیه در چندین مطالعه از سراسر دنیا گزارش شده است، که ژن های *qnr* نامیده می شوند و انواع آن شامل *qnrA*، *qnrB*، *qnrB4* و *qnrS* می باشد (۹۰، ۹۱).

با توجه به این که از زمان تولید نالیدیکسیک اسید در سال ۱۹۶۲ به عنوان اولین داروی خانواده کینولون ها بیش از پنج دهه می گذرد و به دلیل اینکه از این دارو در همان ابتدا در درمان عفونت های ادراری استفاده شده است، بنابراین انتظار می رود که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک از دیگر آنتی بیوتیک های خانواده کینولونی بالاتر باشد. در این مطالعه به طور قابل ملاحظه ای، ۶۳/۳٪ و ۵۵٪ از ایزوله ها مقاومت کامل به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین داشتند. براساس میزان مقاومت به دیسک های نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین نتایج ما نشان داد که از مجموع ۱۵۲ ایزوله مقاوم به کینولون ها، ۱۳۳ (۸۷/۵٪) ایزوله مقاومت سطح بالا و ۱۹ (۱۲/۵٪) ایزوله مقاومت سطح پایین نشان دادند. با وجود اینکه فلئوروکینولون های نسل سوم در ایران اخیرا مورد استفاده قرار گرفته اما تقریبا نیمی از ایزوله های ما به لوفلوکساسین و گتی فلوکساسین مقاوم می باشند. درصد مقاومت به کینولون در کشور چین طی مطالعه ای که توسط Cao و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام شد از بین ۲۲۲ ایزوله *E. coli* جدا شده از عفونت های ادراری در بخش مراقبت ویژه مقاومت بالایی را به فلئوروکینولون ها مشاهده کردند، که میزان آن در ماکسی فلوکساسین ۸۵٪، سیپروفلوکساسین ۷۵٪، لوفلوکساسین ۷۱٪ می باشد (۹۲). در مطالعه ای که توسط Santiso در سال ۲۰۰۹ انجام شد از بین ۹۵ ایزوله *E. coli*، ۷۴ (۷۷/۹٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۹۳). که در مقایسه با این مطالعه آمار بیشتری را نشان دادند. در مطالعه ای که توسط Wang و همکارانش در چین در سال ۲۰۰۸ انجام شد از بین ۳۳۵ ایزوله اشرشیاکلی، ۱۴۶ (۴۳/۶٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند ولی از بین ۳۹۲ ایزوله *K. pneumoniae* ۶۷ (۱۷/۰۹٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۹۴).

در مطالعه ای دیگری که توسط Wang و همکارانش (۲۰۰۴) در آمریکا انجام شد، از بین ۹۰۲۳ ایزوله بالینی *E. coli*، ۳۷۶ (۴/۲٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شد (۹۵). این مطالعات در مقایسه با این مطالعه آمار پایین تری را نشان دادند. طی مطالعه ای که توسط هاشمی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ در ایران انجام شد میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در ایزوله های *E. coli* جدا شده از عفونت های اکتسابی در بیمارستان و جامعه را به ترتیب ۳۵/۹٪ و ۴٪ گزارش کرد (۹۶). مطالعه ای که در ایران انجام شده در مقایسه با این مطالعه آمار پایین تری را نشان دادند، این می تواند به این دلیل باشد که ایزوله های ما از بخش ICU می باشد. در مطالعه ای که توسط نخجوانی و همکارانش (۲۰۰۷) در ایران انجام شد از بین ۱۶۰ ایزوله *E. coli* میزان مقاومت به نالیدیکیسک اسید، افلوکساسین، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین را به ترتیب ۴۹/۳٪، ۴۴/۵٪، ۴۱/۴٪ و ۴۰/۲٪ گزارش کرد (۹۷). Sayel و همکارانش در مطالعه ای (۲۰۱۰) که در عمان انجام دادند فراوانی مقاومت به سیپروفلوکساسین در *E. coli* را ۲۷/۰۲٪ گزارش نمودند (۹۸). که این میزان مقاومت کمتر از مقدار مقاومت یافت شده در مطالعه حاضر است. در مطالعه ای که توسط Tolun و همکارانش در ترکیه انجام شد، از بین ۲۵۸ ایزوله *E. coli* جدا شده از عفونت های ادراری، ۱۳۷ (۵۳/۱٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین و از بین ۵۰ ایزوله *K. pneumoniae* جدا شده از عفونت های ادراری، ۱۷ (۳۴٪) ایزوله مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شدند (۹۹). و در مطالعه ای که توسط Colondner (۲۰۰۸) انجام شد میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین را ۵۰٪ گزارش شد (۱۰۰). که این مقدار مقاومت با میزان یافت شده در مطالعه حاضر تقریباً همخوانی دارد. از اینرو به نظر می رسد پیدایش ایزوله های مقاوم به عوامل آنتی باکتریال وسیع الطیف در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان های ما با استفاده نادرست و گسترده این آنتی بیوتیک ها مرتبط است. مطالعه حاضر شیوع بالای مقاومت کینولونی بواسطه پلاسمید را (۳۸/۸٪) در میان ایزوله های *E. coli* مقاوم به کینولون های جمع آوری شده از بخش های مراقبت های ویژه چندین بیمارستان آموزشی در ایران، نشان می دهد. در مطالعه ای که توسط صدیقی و

همکارانش در سال ۲۰۱۴ در ایران انجام شد فراوانی ژن های *qnrB* و *qnrS* را در بین ۱۲۰ ایزوله *E.coli* را به ترتیب ۸ ایزوله (۶/۶٪)، ۶ ایزوله (۵٪) گزارش کردند (۱۰۱). این مطالعه با مطالعه حاضر آمار پایبندی را نشان می دهد که می تواند به این دلیل باشد که ایزوله های ما از بخش ICU می باشد. در مطالعه ای که توسط Yong و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در کره انجام شد فراوانی ژن های *qnr* را در بین ۱۰۲ ایزوله *E.coli* و *K.pneumoniae* مقاوم به سیپروفلوکساسین جدا شده از کشت خون ۱۴/۷٪ گزارش شد، که از میان آن ها فراوانی ژن های *qnrB4* و *qnrS1* را به ترتیب ۱۰/۸٪، ۳/۹٪ گزارش شد (۱۰۲)، که این مطالعه از نظر ترتیب فراوانی ژن ها با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه ای که Wang و همکارانش در چین در سال ۲۰۰۸ انجام شد از ۲۱۳ ایزوله *E.coli* و *K.pneumoniae* که از نظر فنوتیپی مقاوم به سیپروفلوکساسین هستند، ۱۹ (۸/۹٪) ایزوله دارای ژن *qnr* شدند که غالباً از نظریه وجود *ESBLs* نیز مثبت هستند (۹۴). و در مطالعه ای که توسط بخارایی و همکارانش (۲۰۱۰) در موروکو بر روی ۷۹ ایزوله انتروباکتریاسیه که در ارتباط با *ESBLs* بوده اند انجام شد، شیوع ژن *qnr* در *E.coli* ۱۸/۷٪ گزارش شدند (۱۰۳). Oktem و همکاران (۲۰۰۸) در ترکیه ۷۸ ایزوله انتروباکتریاسیه (۳۴ ایزوله *E.coli* و ۴۴ ایزوله *K. pneumoniae*) *ESBLs* مثبت را مورد بررسی قرار دادند، از این تعداد ۳۷ (۴۷/۴٪) ایزوله به تنهایی به نالیدیکسیک اسید مقاوم بوده و ۳۹ (۷۸/۶٪) ایزوله همزمان به سیپروفلوکساسین نیز مقاومت داشتند، در بین ایزوله های مقاوم به کینولون ها ۵ (۶/۳٪) ایزوله حامل ژن *qnr* می باشد (۱۰۴). در مطالعه ای که توسط زینالی و همکارانش بر روی ۸۳ ایزوله های *E.coli* در سال ۲۰۱۲ انجام شد، ۴۴٪ ایزوله ها *ESBLs* مثبت بودند که از میان آن ها ۵ (۶/۸٪) ایزوله حامل ژن *qnr* بودند (۱۰۵). در مطالعه ای که توسط Zhou و همکارانش (۲۰۱۱) در چین انجام شد فراوانی ژن های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* را در بین ۵۱۴ ایزوله *E.coli* به ترتیب ۲ (۰/۴٪) ایزوله، ۶ (۱/۲٪) ایزوله و ۱۴ (۲/۷٪) ایزوله گزارش شدند (۱۰۶). که این مطالعات در مقایسه با مطالعه حاضر آمار پایین تری را نشان دادند.

نتایج حاصل از MIC روی سویه های غیر حساس به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در این مطالعه، مقاومت های حاصله را تایید کرده و نشان داد وجود ژن *qnr* مقادیر MIC را افزایش می دهد. محدوده MIC در این مطالعه بین ۰/۲۵ تا ۲۵۶ شد. در این مطالعه بر اساس مقادیر MIC از مجموع ۵۹ ایزوله حامل ژن های *qnr*، ۲۸ (۴۷/۱٪) ایزوله MIC آن ها در محدوده ۴-۱۶ $\mu\text{g/ml}$ می باشند و دارای مقاومت حدواسط و ۳۱ (۵۲/۵٪) ایزوله میزان MIC در محدوده ۳۲-۱۲۸ $\mu\text{g/ml}$ می باشند و دارای مقاومت سطح بالا به سیپروفلوکساسین هستند.

مطالعه ای که Tarchouna و همکارانش در تونس (۲۰۱۵) انجام دادند، از مجموع ۱۱۲ ایزوله *E.coli* فراوانی ژن های *qnr* را ۳۲٪ گزارش کردند که از میان آن ها فراوانی ژن های *qnrB* (۱۲/۵٪)، *qnrA* (۵/۳٪)، *qnrS* (۳/۵٪) و همینطور مجموع ژن های *qnrB* و *qnrS* (۲/۶٪)، *qnrA* و *qnrB* (۳/۵٪)، *qnrA* و *qnrS* (۱/۷٪)، *qnrB* و *qnrS* (۲/۶٪) گزارش کردند (۱۰۷). طی مطالعه ای که توسط Stephenson، و همکارانش (۲۰۱۰) در جامائیکا بر روی ۲۵۵ ایزوله کلینیکی انتروباکتریاسیه (۲۳۲ ایزوله *E.coli*، ۲۰ ایزوله *K. pneumoniae*، ۳ ایزوله *Enterobacter*) انجام شد میزان شیوع ژن *qnr* در *E.coli* ۳۰٪ و در *K. pneumoniae* ۵۰٪ می باشد (۱۰۸). در مطالعه ای که توسط منصوری و همکارانش (۲۰۱۳) در ایران بر روی ایزوله های *E.coli* جدا شده از نمونه های بالینی انجام شد میزان شیوع ژن های *qnrA* (۳۱/۸٪)، *qnrB* (۵۶/۵٪) و *qnrS* (۲۸/۹٪) گزارش کرد که این نسبت به مطالعه انجام شده میزان بیشتری را نشان می دهد و دیگر اینکه ژن *qnrA* در مطالعات ما یافت نشده است (۱۰۹). Robicsek و همکارانش (۲۰۰۶) در مطالعه ای که در آمریکا انجام دادند فراوانی ژن *qnrA* را در ایزوله های *E.coli* ۴٪ گزارش کردند، در حالی که در مطالعه انجام شده ژن *qnrA* وجود ندارد (۱۱۰). Corkill و همکاران (۲۰۰۵) در انگلستان با بررسی ۴۷ ایزوله انتروباکتریاسیه مقاوم به سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم جدا شده از موارد باکتری می شیوع ژن *qnr* را در ایزوله های تحت بررسی ۳۲٪ گزارش کرده اند (۱۱۱).

شیوع این ژن در انگلستان به این دلیل است که مطالعه مذکور بر روی ایزوله های به دست آمده از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه که تحت شرایط فشار انتخابی بالا ناشی از مصرف بالای آنتی بیوتیک قرار داشته اند ، انجام گرفته است.

به نظر می رسد که استفاده نامناسب و زیاد از این آنتی بیوتیک های موثر در بخش مراقبت ویژه در بیمارستان های مورد مطالعه می تواند به پدیدار شدن ایزوله های مقاوم در بیمارستان های ما منجر شود. در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید ۶۳/۳٪، سیپروفلوکساسین ۵۵٪، نورفلوکساسین ۵۳/۳٪، گتی فلوکساسین ۵۲/۱٪ ، لووفلوکساسین ۵۳/۸٪ و افلوکساسین ۵۴/۱٪ گزارش شد. در این مطالعه همه ایزوله های *qnr* مثبت مقاومت بالایی به داروهای کینولون نشان دادند. از آن جایی که مقاومت کینولونی بواسطه پلاسمید سطح پایین مقاومت به کینولون را منجر می شود این نتایج می تواند حاکی از سطح بالای مقاومت به علت مکانیزم های دیگر مثل موتاسیون های کروموزومی که در این مطالعه بررسی نشده است، باشد.

در این مطالعه در مجموع ۲۴۰ ایزوله *E.coli* از بخش های مراقبت ویژه مراکز بیمارستانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی قزوین، تهران و کرج جداسازی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله های *E.coli* غالباً از نمونه های بالینی ادرار جمع آوری شدند که بر نقش مهم و قابل توجه این ارگانیسم در ایجاد عفونت هایی بویژه عفونت های وابسته به ابزار های تهاجمی از جمله سوند های ادراری تاکید دارد. بنظر می رسد بستری طولانی مدت بیماران در ICU ، وخیم بودن حال بیماران، بکار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی مواجه بودن بیماران با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و نهایتاً نبود ابزارها و راهکار های مناسب کنترل عفونت از دلایل عمده شیوع ارگانیسم های مقاوم در این بخش می باشد(۱۱۲).

هر چند بیشتر مقاومت نسبت به کینولون ها دارای منشا کروموزومی می باشد اما در سال های اخیر مقاومت کینولونی وابسته به پلاسمید بخصوص در *E.coli* گزارش شده است. هر چند گزارشات کمی از شیوع ژن

های *qnr* در ایزوله های خانواده انتروباکتریاسه جدا شده از ایران وجود دارد (۱۱۳). این مطالعه شیوع مقاومت کینولونی بواسطه پلاسمید را (۳۸/۸٪) در میان ایزوله های *E.coli* مقاوم به کینولون های جمع آوری شده از بخش ICU چندین بیمارستان آموزشی در ایران، نشان می دهد.

در این مطالعه ۹/۲٪ و ۳۵/۵٪ از ایزوله های *E.coli* مقاوم به کینولون، حامل ژن های *qnrS1*، *qnrB4* به تنهایی یا به صورت هم زمان بودند که مطابق گزارش های قبلی نشان داده شد. ما معتقدیم که این اولین گزارش از حضور این ژن ها در ایزوله های *E.coli* جمع آوری شده در سه استان تهران، کرج و قزوین است.

۲-۵ نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که ایزوله های *E.coli* با مقاومت بالای کینولون ها (۶۳/۳٪) و همچنین مقاومت بالای آن ها بواسطه حضور ژن های پلاسمیدی *qnr* (۳۸/۸٪) در مراکز بیمارستانی مورد مطالعه، شیوع قابل توجهی یافته اند. به دلیل اینکه ژن های *qnr* با قرارگیری بر روی ایتنگرون های مختلف باعث گسترش بسیار سریع مقاومت در بین انتروباکتریاسه می شود و با توجه به نقش قابل توجه این ارگانیزم ها در ایجاد انواع عفونت ها و هم چنین افزایش مرگ و میر خصوصا در بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه بیمارستانی، شناسایی این ایزوله ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مقاومت سطح پایین به فلئوروکینولون ها به واسطه ژن های *qnr* باعث کاهش فعالیت باکتریسیدال سیپروفلوکساسین می شود و همچنین این ژن ها باعث کاهش بروز سویه های موتانت کروموزومال (DNA ژیراز و توپوایزومراز IV) می باشند. این سویه ها هر چند که MIC ۱۲۸-۴ برابر مقاومت به فلئوروکینولون ها ایجاد می کنند ولی به طور کلی این میکروارگانیسم ها بر اساس تست های حساسیت دارویی (دیسک دیفیوژن و آگار دیلوشن) ممکن است حساس به نظر رسند، بنابراین این داروها توسط پزشک در درمان مورد استفاده قرار می گیرد و با شکست درمان مواجه می شوند. از آن جایی که تعدادی از ایزوله ها دارای هر دو ژن *qnr* و *ESBL* می

باشند و باعث می شود که مقاومت چندگانه دارویی در اینگونه ایزوله ها افزایش یابد، بنابراین شناسایی به موقع و درمان قطعی با آنتی بیوتیک های مناسب، گسترش سویه های مقاوم را در بیماران کاهش می دهد. هم چنین امید است با بهره گیری از الگوی صحیح مصرف آنتی بیوتیک و بکارگیری برنامه چرخشی آنتی بیوتیک ها و استفاده از ابزارهای مناسب کنترل عفونت، شاهد کاهش شیوع الگو های مقاومت دارویی در بخش های مختلف بیمارستانی باشیم .

۳-۵ پیشنهادات

در این مطالعه علیرغم حضور قابل توجه مقاومت پلاسمیدی *qnr* در ایزوله های *E. coli*، با توجه به میزان مقاومت بالای این ارگانیسم نسبت به مجموعه داروهای کینولونی به کار رفته در این مطالعه، پیشنهاد می شود که در مطالعات بعدی مقاومت با منشا کروموزومی نیز مورد بررسی قرار گیرد. همچنین نظر به میزان مقاومت بالا نسبت به کینولون ها در این مطالعه، پیشنهاد می شود سایر فاکتورهای دخیل در مقاومت از جمله حضور و نقش فاکتور های وابسته به پلاسمید همچون *aac(6')Ib-cr* و پروتئین QepA نیز بررسی شوند. در کنار تلاش برای یافتن داروهای کینولونی جدید، مطالعات بعدی همچنین می تواند در راستای جستجو از جهت یافتن مهارکننده های مقاومت کینولونی و افزودن آن به داروهای موجود از جهت تولید داروهای ترکیبی صورت پذیرد. چنانچه امروزه مطالعات زیادی بر روی ترکیبات مهارکننده پمپ های افلاکس مانند ترکیبات کربونیل سیانید کلر فنیل هیدرازین از جهت افزایش کارایی کینولون ها انجام گرفته است.

References

1-Jain S, Khety Z. Changing antimicrobial resistance pattern of isolates from an ICU over a 2 year period. *J Assoc Physicians India*. 2012 May; 60:277-833

- 2-Mohmmadi-Mehr M, Feizabadi MM. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli isolated from patients at ICUs of Army hospitals in Iran.*Iran J of Microbiol.* 2011 March ; 61(1) :26-30
- 3-Curcio DJ, Antibiotic prescription in intensive care units in Latin America. *Rev Argent Microbiol.* 2011 Jul; 43(3):203-11.
- 4-Jain S, Khety Z. Changing antimicrobial resistance pattern of isolates from an ICU over a 2 year period. *J Assoc Physicians India.* 2012 May; 60: 27-8– 33.
- 5- Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in the United Arab Emirates. *Med Princ Pract.* 2008; 17(1): 32-6.
- 6- Sharifi M, Asefzadeh M, Javadi A, Kargar A. Shoue Clonizasion *Stafilococos aeureus* Moghavem Be Meticilin Dar Bimarane Bastari Dar Bakhshhaye Moraghebate Vije Marakeze Amozeshi Darmani Ghazvin.. *Majalleh Microb shenasi Iran.* 1384; (2, 3.4) 0-46.
- 7- Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, Quale J. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis.* 2007 Apr; 44(7):972-5.
- 8- Kuntaman.K, Lestari.E, Juliëtte A. Severin, Irma M. Kershof, Mertaniasih.N, Purwanta.M, Hadi.U, James R. Johnson, Belkum,and.A and Henri A. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Indonesia. *Emerg Infect Dis.*2005 Sep; 11(9)
- 9- Jurado S, Orden JA, Horcajo P, Fuente R, Ruiz JA, Martí´nez S, Domí´nguez G. Characterization of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* strains from ruminants. *J VET Diagn Invest.* 2008; 20: 342
- 10- Asensio A, Alvarez T, Fernandez J, Ramos A, Vaqu J, Bishopberger C, Navarrete MJ, Calbo F, Campayo J, Canton R.trend in yearly prevalence of third-generation cephalosporin and fluoroquinolone resistance Entrobacteriaceae infections and antimicrobial use in spanish hospitals. spain. 1999 to 2010. *Euro Surveill.* 2011 oct; 16(40).

- 11- Goto K, Kawamura K, Arakawa Y. Contribution of QnrA, a Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Peptid to Survival of *Escherichia coli* Exposed to a Lethal Ciprofloxacin Concentration. *Jpn.J.Infect.Dis.*2015; 68:196-202
12. Piekarska K1, Rzeczkowska M, Chróst A, Wołkowicz T, Zacharczuk K, Bareja E, Olak M, Gierczyński R. Occurrence and characterisation of aac (6')-Ib-cr gene encoding fluoroquinolone-modifying enzyme in clinical ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* strains isolated in Poland. *Med Dosw Microbiol.* 2013; 65(1):39-46.
- 13 http://www.who.int/mediacentre/multimedia/podcasts/2011/whd_20110408/en/
- 14-Brooks G.F, Carroll K.G. Butel J.S. Jawetz, Melnick, and Adelberg´S. Medical microbiology. 26th ed. Los Altos, CA: Appleton & Lange; 2013. 229-245.
- 15-Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Review of medical microbiology. 7th ed. Philadelphia: Mosby; 2013.258-265.
- 16-Cheasty T, Smith HR. *Escherichia*.In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino EA. Bailey and Scott`s diagnostic microbiology. 13th ed. St. Louis: Mosby; 2014.323-333.
- 17- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis Jr G. Textbook of diagnostic Microbiology. 4th ed. Philadelphia: W.B. Sanders Company. 2010: 335-350.
- 18- Topley WWC, Wilson GSS, Mahy BWJ. *Topley & Wilson's microbiology & microbial infections*. 10th ed. / edited by Brian W.J. Mahy ... [et al.]. ed. London: Hodder Arnold; 2005.
- 19- Sharon L. Abbott, Jennifer O'Connor, Tom Robin, Barbara L. Zimmer, and J. Michael Janda. Biochemical Properties of a Newly Described *Escherichia* Species *Escherichia albertii*· *J OF CLINic MICROBIO*.2008 Oct; 41(10): 4852–4854
- 20- Aggeliki P, Evangelia D, Fani M, and Athanassios T· *Escherichia hermannii* as the Sole Isolate from a Patient with Purulent Conjunctivitis. *J of Antimicrob Chemother.* 2008 Nov; 3848- 3849
- 21- Guillermo M. Rimoldi and Robert B. Moeller Jr. *Escherichia fergusonii* Associated with Pneumonia in a Beef Cow. *J of Veter Med.*2013

- 22- Lesley AC ¹, Uchechukwu UN ¹, Anthony I ¹, Roland NN ^{1,2} and Ezekiel G. Occurrence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Raw Cow's Milk from Two Commercial Dairy Farms in the Eastern Cape Province, South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2014; 11: 11950-11963
- 23- Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, and Denamur E. The Link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun*. 2009; 546–553
- 24- Riberio M, Yano Tand Silva Leite D. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Inst Med trop Sao Paulo*. 2008; 50(5):255-260
- 25- Ieri L, Apan TZ, Aksoy A, Koç F, Göçmen JS, Nuristani D. The prevalence of enterotoxigenic *E.coli* isolated from the stools of children aged 0-10 years with diarrhea in mid anatolia region, Turkey. *Braz J of Microb*. 2011; 42: 243-247
- 26- Robert S. Gerrish, James E. Lee,* Reed J,* Williams J, Larry D. Farrell,* Kathleen M. Spiegel,* Peter P. Sheridan,* and Malcolm S. Shields. PCR versus Hybridization for Detecting Virulence Genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 2007 Aug; 13(8)
- 27- Piekrard D, Stevens D, Moriau L, Lior H, Lauwers S. Isolation and virulence factors of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin. Microbiol. Infec*. 1997; 3: 531–540.
- 28- Alteri CJ, Hagan EC, Sivick KE, Smith SN, Mobley HLT. Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathog*. 2009.
- 29- Croxall G, Hale J, Weston V, Manning G, Cheetham P, Achtman M, McNally A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *J. Antimicrob. Chemother*. 2011; 66: 2501–2508.

- 30- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev.* 2010, 26–38.
- 31- Celis R, Torres A, Gatell JM, et al. Nosocomial pneumonia: a multivariate analysis of risk and prognosis *Chest* .1988; 93: 318-24.
- 32-CARRIE ARMSTRONG. Updated Guideline on Diagnosis and Treatment of Intra-abdominal Infection. 2010 Sep; 82(6)
- 33- Abdi HA, Rashki A. Comparison of Virulence Factors distribution in Uropathogenic *E. coli* Isolates From Phylogenetic Groups B2 and D. *Int J Enteric Pathog.* 2014 November; 2(4): e21725.
- 34- Justyna B, Olga S, and Przemyslaw B. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Inter J of Nephro.*2012
- 35-Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* Mar 2008; 8(3):159-6
- 36- Hagan EC, Mobley HL. *Uropathogenic Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect. Immun.* 2007, 75, 3941–3949
- 37- Siriluck A, Patapong T and Prajuab C· RISK FACTOR AND CLINICAL OUTCOMES OF EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE (*ESBL*)-PRODUCING *ESCHERICHIA Coli* SEPTICEMIA AT SRINAGARIND UNIVERSITY HOSPITAL, THAILAND. *SouthEaSt aSian J troP mEd PuBLic hEaLth.*2010september; 43(5)
- 38-Ananias M and Yano T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis.*Braz J Med Biol Res.*2008;41(10):877-883
- 39- Latife I, Teoman ZA, Altan A, Figen K, Jülide SG, Diba N. THE PREVALENCE OF *ENTEROTOXIGENIC E.COLI* ISOLATED FROM THE STOOLS OF CHILDREN AGED 0-10 YEARS WITH DIARRHEA IN MID-ANATOLIA REGION, TURKEY.*Braz J of Microb.*2011; 42: 243-247

- 40-Okoh AI, Osode AN. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): A recurring decimal in infants' and travelers' diarrhea. *Rev. Environ. Health* 2008; 23: 135–148.
- 41- Kumar A, Grover S, Batish B.K. Application of multiplex PCR assay based on *uidR* and *fliCH7* genes for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J. General Appl. Microbiol.* 2013; 59: 11–19.
- 42- Guh A, Phan Q, Nelson R, Purviance K, Milardo E, Kinney S, Mshar P, Kasacek W, Cartter M. Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with raw milk, Connecticut, 2008. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51: 1411–1417
- 43-Ruan X, Crupper SS, Schultz BD, Robertson DC, Zhang W. *Escherichia coli* expressing EAST1 toxin did not cause an increase of cAMP or cGMP levels in cells, and no diarrhea in 5-day old gnotobiotic pigs. *PLoS One.* 2012
- 44-- Bugarel M, Martin A, Fach P, Beutin L. Virulence profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: A basis of molecular risk assessment of atypical and typical EPEC strains. *BMC Microbiol.* 2011.
- 45- Campellone KG. Cytoskeleton-modulating effectors of *enteropathogenic* and *enterohaemorrhagic Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *Febs J.* 2010.
- 46-Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang TA. Review of emerging enteric pathogen: Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 2006; 1303–1311.
- 47-Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, Khanam J, Nandy SRK, Bhattacharya SK, Ramamurthy T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of *enteroaggregative Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 4111–4120.
- 48-Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *Fems Microbiol. Lett.* 2005; 252: 11–18.
- 49- Camins BC, Marschall J, De Vader SR, Maker DE, Hoffman MW, Fraser VJ. The clinical impact of fluoroquinolone resistance in patients with *E coli* bacteremia. *J Hosp Med.* Jul 2011; 6(6):344-9.

- 50-Walmsley RS, David DB, Allan RN, Kirkby GR. Bilateral endogenous *Escherichia coli* endophthalmitis: a devastating complication in an insulin-dependent diabetic. *Postgrad Med J*. Jun 1996; 72(848):361-3.
- 51- Becnel Boyd L, Maynard MJ, Morgan-Linnell SK, Horton LB, 51Sugang R, Hamill RJ, et al. Relationships among ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, and norfloxacin MICs for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 229–234.
- 52- Liam S. Redgrave, Sam B. Sutton, Mark A. Webber, and Laura J.V, Piddock. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Tren in Microbiol*. 2014 Aug; 22(8)
- 53-Emami S, Shafiee A and Foroumadi A. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *Iran J of Pharma Res*. 2010; 3: 123-136
- 54-Igor A. Parshikov • John B. Sutherland. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drug *J of Ind Microbial & Biotech*. 2012 Dec; 35(12): 1731-1740
- 55-Boteva AA, Krasnykh OP. The methods of synthesis, modification, and biological activity of 4-quinolones. *Chem Heterocycl Comp*. 2009; 45:757–785
- 56- Efthimiadou EK, Psomas G, Sanakis Y, Katsaros N, Karaliota A. Metal complexes with the quinolone antibacterial agent N-propyl-norfloxacin: synthesis, structure and bioactivity. *J Inorg Biochem*. 2007 Mar; 101(3):525-35
- 57-Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N: Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochem*. 2014; 53:1565-1574.
- 58- Fabrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*. 2009; 2: 40-61
- 59- Versalovic J, American Society for Microbiology. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011.

- 60-Moellering RC Jr. The fluoroquinolones: the last Samurai? *Clin Infect Dis* 2005; 41(suppl 2): S111–S112.
- 61-Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishanan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in india, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10(9): 597-602
- 62-UpToDate Inc. May 2011: <http://www.uptodate.com>
- 63-75. World Health Organization. May 2011: <http://www.who.int>
- 64- Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6(5):671-83.
- 65-Tamma PD, Cosgrove SE. Antimicrobial stewardship. *Infect Dis Clin North Am*. 2011; 25(1): 245-60
- 66- Zayed AAF, Essam TM, Hashem AGM and Tayeb OME. Supermutators' found amongst highly ciprofloxacin-resistant *E.coli* isolates: a rapid protocol for the detection of mutation sites. *Emerg Microbes and Infect*. 2015; 4
- 67-Amsterdam D. Antibiotics in laboratory Medicine. 6th ed. New York: Williams and Wikins. 2014.
- 68-Dale JW, Park SF. Molecular genetics of bacteria. 5th ed. Chichester: John Wilkins, 2010.
- 69-Sallen B, Rajoharison A, Desvarennes S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integrin-associated antibiotic resistance genes in isolates of Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 1995 fall; 1(3): 195-202
- 70- Guan X, Xue X, Liu Y, Wang J, Wang Y, Wang, Kaifei Wang J, Jiang H, Zhang L, Yang B, Wang N and Pan N. Plasmid-mediated quinolone resistance current knowledge and future perspectives. *J of Inter Med Res*. 2012 Sep.
- 71-Tomasic T, Masic LP: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr Top Med Chem* 2014; 14:130-151.

- 72-Saboochi R, Rajaei B, Sepehri Rad N, Razavi MR, Aghasadeghi MR, Moshiri A, et al. Molecular detection and association of QnrA, QnrB, QnrS and blaCMY resistance genes among clinical isolates of salmonella spp. *In iran Adv Microbiol.* 2014; 4: 63-68
- 73-Tari LW, Li X, Trzoss M, Bensen DC, Chen Z, Lam T, Zhang J, Lee SJ, Hough G, Phillipson D et al.: Tricyclic GyrB/ParE (TriBE) inhibitors: a new class of broad-spectrum dual-target antibacterial agents. *PLOS ONE* 2013; 8:e84
- 74-Razieh PJ and Ehsan M. Study of Mutations in the DNA gyrase *gyrA* Gene of *Escherichia coli*. *Iran J of Pharm Res.* (2010); 9 (1): 43-48
- 75- Poirel L, Cattoir V and Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Antimicrob Resis and Chemother.* 2012 Feb.
- 76- KaaZ M, Tuba I, Alper Ç, Serdar D. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* strains isolated from animals in Turkey 2012.
- 77-Sonia KML, Lauren BB, David S, Lynn Z· Mechanisms Accounting for Fluoroquinolone Resistance *Escherichia coli* Clinical Isolates. *ANTIMICROB AGE AND CHEMOTHER.* 2009 Jan: 235–242
- 78- George A. Jacoby, Jacob Strahilevitz, and David C. Hooper. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr.* 2015; 2(2)
- 79-Soleimani-Asl Y, Zibaei M, Firoozeh F. Detection of *qnrA* gene among quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012. *J of Kashan Uni of Med Sci.* 2013 Nov; 17(5).
- 80-Naderi-Nasab M, Meshkat Z, Harifi E. Evaluation of *qnr* genes' frequency in ESBLs and non-ESBLs *E. coli* isolated from Clinical specimens of patients referred to Imam Reza Hospital during 2012. *Microbiol and Virol Res Cen*, Mashhad Uni of Med Sci, Mashhad, IR Iran.
- 81- Firoozeh F, Zibaei M, Soleimani-Asl Y · Detection of plasmid-mediated *qnr* genes among the quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates in Iran. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(7):818-822

- 82-Jeong HS, Bae IK, Shin JH, Jung HJ, Kim SH, Lee JY,. Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in Enterobacteriaceae. *Korean J Lab Med*. 2011 Oct; 31(4):257-64.
- 83-Shyamala R and Rao J.The resistance pattern of *Escherichia coli* to Ciprofloxacin in a tertiary care hospital. *Der Pharmacia Lettre*. 2012; 4(6):1843-1845
- 84-Hassan WH, Hashim A, Domany RAA.plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, and *qep* in ESBL producing *Escherichia coli* clinical isolated from Egypt.india *J of med microbiol*.2012;30(4):442-7
- 85-Cai X, Li C, Huang J and Li Y. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in Central China. *Afr. J. Microbiol. Res*. 2011 May; 5(7): xxx-xxx
- 86-Hee Kim M, Joo Lee H, Sun Park K, and Tae Suh J.Molecular Characteristics of Extended Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the Prevalence of *qnr* in Extended Spectrum β -lactamase Isolates in a Tertiary Care Hospital in Korea. *Yonsei Med J*. 2010 Sep; 51(5):768-774
- 87-Vasilaki O, Ntokou E, Ikonomidis A, Sofianou D, Frantzidou F, Alexiou-Daniel S, Maniatis AN and Pournaras S. Emergence of the Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene *qnrS1* in *Escherichia coli* Isolates in Greece. *Antimicrob Agents Chemother*.2008 Aug; 52(8):2996-2997.
- 88- Pakzad I, Ghafourian S, Taherikalani M, sadeghifard N, Abtahi H, Rahbar M, Mansory Jamshidi N. *qnr* Prevalence in Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) and None-ESBLs Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections in Central of Iran. *Iran J of Bas Med Sci*.2011Sep; 14(5): 458
- 89- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Supplement M100-S24, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. (2014)
- 90-Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM, Carattoli A, Prats G. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacterial* isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2):291–295.

- 91-Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22: 664–89.
- 92- Cao X, Cavaco LM, Lv Y, Li Y, Zheng B, Wang P, Hasman H, Liu Y, and Aarestrup FM. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections in 20 Chinese Hospitals. *J OF CLINIC MICROBIOL.* 2011 Jul; 49(7): 2496–2501.
- 93-Sntiso R, Tamayo M, Fernandez JL, delCarmen Fernandez M, Molina F, Villanueva R, et al. Rapid and simple determination of ciprofloxacin resistance in clinical strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:2593-5.
- 94- Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Ding H, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L and Shen X. Presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infect Dis.* 2008; 8:68
- 95-Minngui Wang, Daniel F. Sahm, George A. Jacoby and David C. Hooper. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated With the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumonia* Clinical isolates in the Unitedstates. *Antimicrob Agent Chemother.* 2004; 48(4): 1295
- 96-hashemi SH, Esna-Ashari F, Tavakoli S, Mamani M. The prevalence of antibiotic resistance of enterobacteriaceae strains isolated in community- and hospital-acquired infections in teaching hospitals of Hamadan, west of Iran. *J Res Health Sci.* 2012; 13:75-80.
- 97- Nakhjavani FA, Mirsalehian A, Hamidian M, Kazemi B, Mirafshar M, Jabalameli F. Antimicrobial Susceptibility Testing for *Escherichia coli* Strains to Fluoroquinolones, in Urinary Tract Infections. *Iranian J Publ Health.* 2007; 36(1):89-92
- 98- SQ, Zehra A, Naqvi BS, Shah S, Bushra R. Resistance pattern of ciprofloxacin against different pathogens. *Oman Med J.* 2010; 25: 294-8.
- 99-Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-AKbulut D, Catal C, Ang-Kucuker M, Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production

- in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clinic Microbiol and Infect.* 2004 Jun; 10(1): 72-5
- 100-Colondner R, Kometiani I, Chazan B, Raz R. Risk factors for community-acquired urinary tract infection due to quinolone-resistant *E.coli* Infection. 2008;36:41-597.
- 101- Sedighi I¹; Arabestani MR; Rahimbakhsh A; Karimitabar Z; Alikhani MY. Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamases and Quinolone Resistance Genes Among Clinical Isolates of Uropathogenic *Escherichia coli* in Children.
- 102-Yong MY, Nam YS, Lee HG. Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *J Infect Dis Med Microbial.* 2014; 25(3)
- 103- Bouchakour M, Zerouali K, Claude J, Amarouch H, Mdaghri N, Courvalin P and Timinouni M. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing *enterobacteriaceae* in Morocco. *J Infect Dev Ctries* 2010; 4(12):799-803
- 104-Oktem IM¹, Gulay Z, Bicmen M, Gur D; HITIT Project Study Group Jpn J Infect Dis. *qnrA* prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. 2008 Jan; 61(1):13-7.
- 105-Ziani FR, Meshkat Z, Naderi NM, Khaje- Karamadini M, Ghazvini K, Rezaee A, et al. The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Basic Med Sci.* 2012; 15:654-60.
- 106- Zhou TL, Chen XJ, Zhou MM, Zhao YJ, Luo XH, Bao QY. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002-2008. *Japanese J Infect Dis.* 2011; 64:55-7.
- 107- Tarchouna M, Ferjani A, Marzouk M, Guedda I and Boukadida J. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants among Clinical Isolates of *Escherichia coli* in a Tunisian Hospital. *Int.J.Curr.Microbial. App.Sci.* 2015; 4(3): 195-206

- 108- Stephenson S, Brown PD, Holness A, Wilks M. The Emergence of *Qnr*-Mediated uinolone Resistance among *Enterobacteriaceae* in Jamaica. *West Indian Med J*. 2010; 59 (3): 241
- 109-Mansouri Jamshidi N^{1*}, Pakzad I², Tabaraei B¹, Hadadi A. Evaluating the Frequency of Ciprofloxacin Resistance Qnr Genes in Escherichia Coli Strains Isolated From Clinical Samples of Imam Khomani and Milad Hospitals in Ilam and Tehran, Iran. *Dept of Clinical Microbiology*. 2013 Sep
- 110-Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. Qnr prevalence in ceftazidime-resistance *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2872-4.
- 111-Corkil JE, Anson JJ, Hart CA, High prevalence of the Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistance *Enterobacteriaceae* from blood cultures Liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(3): 1115-17.
- 112- Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, et al. Detection of class 1 and 2 *integrons*, *extended-spectrum β -lactamases* and *qnr* alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36: 453–8.
- 113- Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallègue O, Nordmann P. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* from Tunisia. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1019–2

ضمیمه

ضمیمه ۱

طرز تهیه محیط کشت مولر هیتون آگار

محیط کشت استاندارد مورد استفاده در انجام آنتی بیوگرام، محیط مولر هیتون آگار می باشد (در این مطالعه از محیط های کشت ساخت BD آمریکا استفاده شده است)، محیط کشت با ضخامت یکسان در تمامی نقاط و به قطر ۴ میلی متر و با PH برابر ۷/۲ تا ۷/۴ تهیه شد. PH محیط کشت باید قبل از بسته شدن محیط با PH متر سنجیده شود تا از صحت عدد PH ذکر شده بر روی قوطی محیط مولر اطمینان حاصل گردد.

ضمیمه ۲

تهیه محلول استاندارد نیم مک فارلند

به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱ v/v، ۰/۵ میلی لیتر محلول ۱۷۵ w/v و کلرید باریوم (BaCl₂ - 2H₂O) اضافه و خوب مخلوط کرده، سپس سولفات باریوم را به میزان ۴-۶ ml در لوله در پیچ دار ریخته و در مکان تاریک در دمای محیط (اتاق) نگهداری می کنند. نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر دارای کدورتی برابر ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ می باشد. نمودار تهیه انواع غلظت های مک فارلند در جدول ۲۵ نشان داده شده است. قبل از استفاده محلول نیم مک فارلند، لوله بایستی کاملاً بهم زده شود تا کدورت یکنواختی ایجاد نماید. استاندارد سولفات باریوم باید به صورت ماهانه جایگزین شود با جذب آن اندازه گیری گردد.

جدول ۲۲ : غلظت‌های مختلف از محلول مک فارلند

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Transmittance*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

*at wavelength of 600 nm

ضمیمه ۳

طرز تهیه TBE بافر

۵۴ گرم تریس را با ۲۷/۵ گرم بوریک اسید در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده سپس ۲۰ میلی لیتر EDTA (۰/۵ مولار) به آن اضافه کرده و حجم را به یک لیتر می رسانیم.

ضمیمه ۴

EDTA (۰/۵ مولار)

۱۸/۱۶ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و PH را با استفاده از NaOH به ۸ رسانده و سپس توسط اتوکلاو استریل می گردد.

Abstract

Background and Objective

Escherichia coli is an opportunistic pathogen that can causes nosocomial infections especially in intensive-care-unit (ICU). The occurrence of Plasmid-mediated quinolone resistance (*qnr*) has been steadily increased in recent years, resulting in limitation of therapeutic options. The aim of this study were to determine frequency of plasmid mediated fluoroquinolone resistance (*qnr*) genes among clinical isolates of *Escherichia coli* in ICU Patients.

Materials and methods

A total of 240 *E.coli* isolates were collected from patients of ICU in Qazvin, Karaj and Tehran. Bacterial identification was initially performed by standard laboratory methods. Quinolone resistance were determined by disk diffusion methods and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by agar dilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). PCR and Sequencing were conducted for detection of *qnr* genes *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes.

RESULT: Out of 240 isolate of *E.coli*, 152(63.3%) isolates were non-susceptible to any of quinolone compounds used in this study among those, 133(87.5%) and 19(12.5%) isolates high and low level quinolone resistance. Based on the results of disk diffusion method, the resistant rate to Gatifloxacin, Levofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Nalidixic acid was 125(52.1%), 129(53.8%), 130(54.1%), 128(53.3%), 132(55%), 152(63.3%) respectively. Out of 137 *E.coli* isolate resistance to ciprofloxacin, 123 of which had MICs values of 4-256µg/ml. PCR and sequencing showed that 59(38.8%) isolate were positive for *qnr* genes. *qnrB4* 45(29.6%) was the most common gene followed by *qnrS1* 5 (3.2%), either alone or in combination. *QnrB4* were co existe with *qnrS1* in 9(5.9%) isolates. *QnrA* and *qnrB* were not found in this study.

Conclusion: The present study shows high prevalence of quinolone resistance and plasmid mediated *qnr* genes in clinical isolates of *E.coli* from ICU patients. Rational administration of

antibiotic and appropriate infection control policies may reduce resistance rates in clinical isolates of *E.coli* from ICU.

Key words: *Escherichia coli*, fluoroquinolone resistance, *qnr*, ICU



Qazvin University of Medical Sciences

School of Medicine

Title:

Frequency of plasmid mediated fluoroquinolone resistance (*qnr*) genes among clinical isolates of *Escherichia coli* from Intensive Care Units (ICU) in Qazvin, Karaj and Tehran

Supervisor: Dr. Masoumeh Aslanimehr

**Advisor: Dr. Amir Peymani
Dr. Ameneh Barikani**

By: Farnaz yousefi

2015-2016



به نام خدا

صورتجلسه دفاع از پایان نامه
فرم شماره (۳)

معاون محترم پژوهشی دانشکده پزشکی:

با سلام،

بدینوسیله به استحضار می‌رساند پایان نامه دانشجویی / تخصصی با عنوان فرماندهی و مدیریت
سیستم‌های هوشمند در سیستم‌های پزشکی (۹۵/۹۶) در تاریخ ۹۵/۷/۱ در دانشکده پزشکی / بیمارستان های تخصصی / کرج و همکاران
متعلق به خانم / آقای فریاد آری به راهنمایی سرکار خانم / جناب
آقای دکتر محمود احمدی در تاریخ ۹۵/۷/۱ دفاع گردید و با نمره ۱۸-۸
معدل عمید هوشمند مورد قبول هیئت داوران نامبرده در ذیل قرار گرفت.

مهر و امضاء هیئت داوران:

۱-

دکتر محمود احمدی

۲-

مهر و امضاء استاد / اساتید
راهنما:

مهر و امضاء استاد / اساتید
مشاور:

۱-

دکتر آری

۲-

دکتر آری

۳-

مهر و امضاء اساتید داور:

۱-

دکتر آری

۲-

خانم فتوح

۳-

دکتر آری

۹۵/۷/۱ مهر و امضاء

معاون پژوهشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)

مدیر گروه فریاد آری

* یادآوری :

مطابق آیین نامه، جلسه دفاعیه هنگامی اعتبار دارد که حداقل نصف به علاوه یک اعضاء هیئت داوران در
جلسه حضور داشته باشند (حضور اساتید راهنما و مشاور و معاون پژوهشی گروه / ناظر در جلسه دفاع
الزامی است.
نمره اعلام شده، معدل نمرات در جلسه دفاعیه است [اساتید راهنما، اساتید مشاور، داوران و
معاون پژوهشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)] که توسط معاون پژوهشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)
مع بنده و به دانشکده اعلام می‌شود.